

LUIZA HELENA URSO PITASSI

Infecção experimental dos eritrócitos humanos pela
Bartonella henselae

CAMPINAS

Unicamp

2007

LUIZA HELENA URSO PITASSI

Infecção experimental dos eritrócitos humanos pela
Bartonella henselae

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica,
área de concentração Clínica Médica

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P68i Pitassi, Luiza Helena Urso
 Infecção experimental dos eritrócitos humanos pela *Bartonella*
 henselae. / Luiza Helena Urso Pitassi. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Bartonella henselae*. 2. Eritrócitos. 3. Microscopia eletrônica.
I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Experimental *Bartonella henselae* infection of human erythrocytes

Keywords: • *Bartonella henselae*

- Erythrocytes
- Electron microscopy

Área de Concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica médica

Banca examinadora: Prof^o. Dr^o. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Cintra

Prof^a. Dr^a. Patrícia Érika Dalton

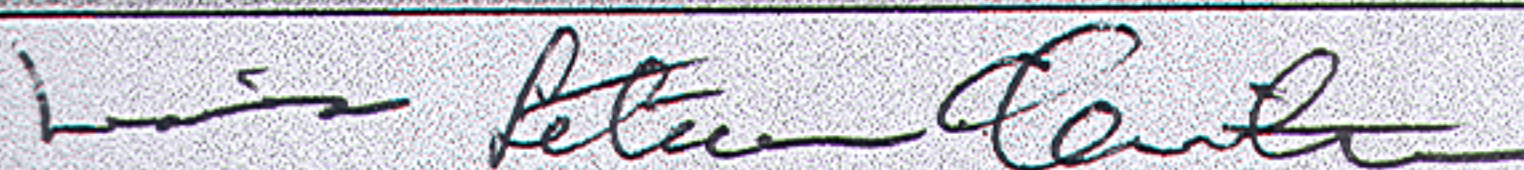
Data da defesa: 23 - 08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

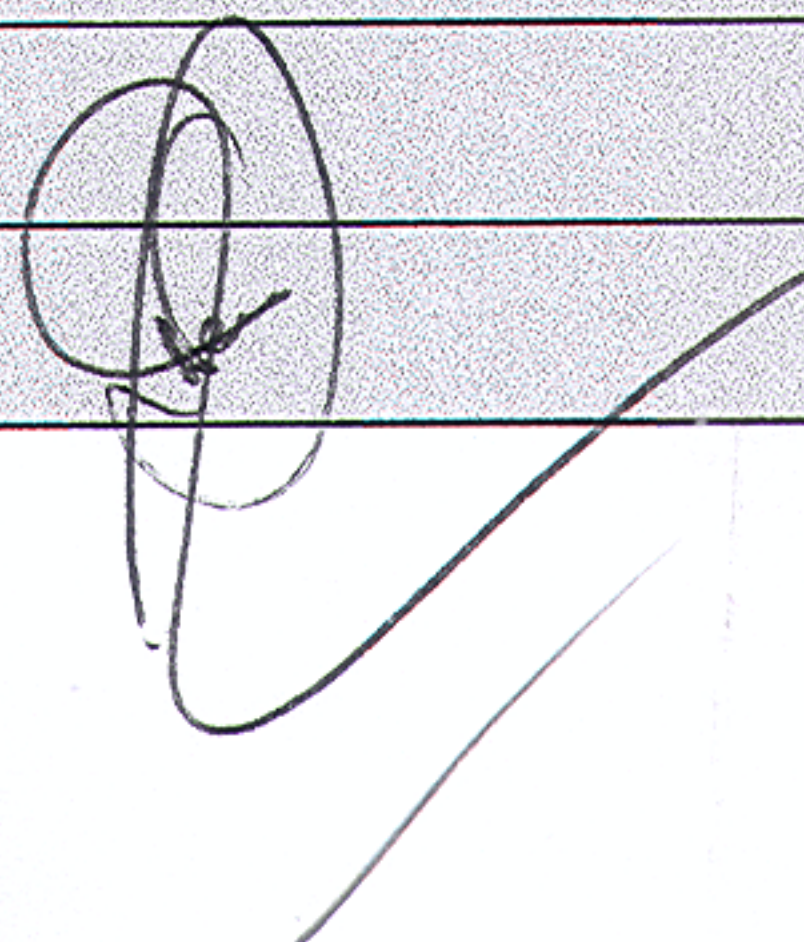
Membros:

1- Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Cintra



2- Prof^a. Dra. Patrícia Érika Dalton

3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

2008 03814

Data da Defesa: 23 de agosto de 2007.

*Aos meus pais,
pelo amor maior.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar todos os dias nesta jornada e por iluminar os meus passos.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, pela extrema dedicação, amizade e profissionalismo na orientação deste estudo. A sua competência e caráter são exemplos que sempre seguirei com muito orgulho. Muito obrigada pela confiança e por me acolher em todos os momentos.

Aos meus amados pais por toda força, união e amor. Vocês são a minha luz.

Ao Renato pelo amor, cumplicidade e incentivo. Você é a doce música que vem do coração, parte essencial da minha vida. Aos queridos Fernando, Sueli e Iago, nossa querida família.

À minha irmã Rita, pelo amor, cuidado e dedicação em todos os momentos. Aos meus queridos Lu, Laísa, Iago e Iury, minha doce família. Obrigada por serem tão especiais.

Ao meu irmão Júnior, por sempre me incentivar e vibrar com as minhas conquistas. Cris, Maria Clara e Manuela, juntas conquistaremos muitas estrelas.

À minha tia Jô por ser tão presente e especial na minha vida.

Aos queridos Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula e Prof^a. Dr^a. Mônica de Cássia Alves de Paula, amigos essenciais que me apoiaram em cada passo desde o início da Pós-Graduação. Aprendi muito com a competência e o profissionalismo de vocês. Vocês são responsáveis por grande parte desta vitória. Obrigada, Theo, Lia, pela doce presença.

À Prof^a. Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro por sempre me receber com carinho e pela ajuda fundamental na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rovilson Gilioli, por todo o conhecimento compartilhado e pela paciência ao me ensinar no início deste projeto.

Aos funcionários do laboratório de microbiologia do Hospital de Clínicas, especialmente Marizete Salvadego, por cuidar do cultivo das bartonelas com tanto carinho e Luzia Lyra. Obrigada pelo apoio e amizade de vocês.

À Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Cintra pela competência, carinho e disposição em nos ajudar em todos os momentos.

À Lucinha e Gê, funcionárias da microscopia eletrônica do Hospital de Clínicas. Não sei como expressar a minha gratidão por tanta torcida, profissionalismo e carinho. Vocês foram essenciais para que este projeto se realizasse. Obrigada de coração.

Ao Adílson, que cuidou das fotos das bartonelas com tanta presteza.

À Renata, secretária da subcomissão de Pós-Graduação da Clínica Médica, pelo carinho e conselhos compartilhados.

À Cristiane, funcionária da Pós-Graduação da Clínica Médica, por estar sempre disposta a me ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Aparecida Machado de Moraes e a Prof^a. Dr^a. Mariam Auada-Souto por terem participado da banca de qualificação. Obrigada pela contribuição e pelo grande estímulo.

À Dra. Renata Magalhães e a Dra. Fernanda Herreros, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

À Mariane e Richelle, amigas tão especiais que sempre estiveram presentes em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Elemir Macedo e a todos os residentes de Dermatologia da UNICAMP.

Aos preciosos colaboradores: Prof. Dr. Paulo Joazeiro, Marcina Garcia e Ronald Santos.

Aos meus amigos de alma José Paulo, João Gustavo, Clarissa, Danielle, Izabella, Flavia, Luciana, Adriana, Juliana, Gabriela, Merlei, Paulo e Fernando, que sempre me incentivaram e me fizeram acreditar que todo o esforço valeria a pena. A todos os amigos e familiares que vibraram e me estimularam neste projeto, obrigada.

	Pág.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	17
1.1- As bartonelas	18
1.2- As bartoneloses	22
1.2.1- Doença de Carrión.....	24
1.2.2- Febre das trincheiras.....	25
1.2.3- Doença da arranhadura do gato.....	26
1.2.4- Angiomatose bacilar.....	28
1.2.5- Outras doenças.....	29
1.3- A <i>Bartonella henselae</i>	30
1.4- Infecção de células e de eritrócitos	31
1.5- Ultra-estrutura das bartonelas	32
1.6- Métodos diagnósticos	33
1.6.1- Exame direto.....	34
1.6.2- Cultura.....	34
1.6.3- Exame histopatológico.....	34
1.6.4- Sorologia.....	35
1.6.5- PCR.....	36
1.6.6- Microscopia eletrônica de transmissão.....	36

2- OBJETIVO.....	38
3- MÉTODOS.....	40
3.1- <i>Bartonella henselae</i>.....	41
3.2- Crescimento das colônias.....	41
3.3- Suspensão bacteriana.....	41
3.4- Infecção experimental do eritrócito humano.....	41
3.5- Microscopia eletrônica de transmissão.....	42
3.6- Critério para identificação da <i>Bartonella henselae</i> à microscopia eletrônica de transmissão.....	42
4- RESULTADOS.....	43
5- DISCUSSÃO.....	46
6- CONCLUSÃO.....	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8- ANEXO.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Angiomatose bacilar
BHI	“Brain Heart Infusion”
CH	Concentrado de hemácias
CO₂	Dióxido de carbono
DAG	Doença da arranhadura do gato
DC	Doença de Carrión
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FT	Febre das trincheiras
g	grama
°C	Grau Celsius
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
LC	Linfadenopatia crônica
µm	micrômetro
ME	Microscopia eletrônica
mL	mililitro
nm	nanômetros
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBH	Peliose bacilar hepática
RNA	Ácido ribonucléico

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 Características clínicas e epidemiológicas das espécies de <i>Bartonella</i> identificadas (em destaque, as espécies relacionadas a doenças humanas).....	21
Quadro 2 Epidemiologia das principais espécies patogênicas ao homem.....	22

	Pág.
Figura 1 Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a adesão da <i>B. henselae</i> ao eritrócito humano após 10h da infecção. A análise da ME demonstrou a típica parede trilaminar (Aumento original x 20.000).....	44
Figura 2 Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a invasão do eritrócito humano pela <i>B. henselae</i> após 72h da infecção (Aumento original x 35.970).....	45
Figura 3 Microscopia eletrônica das colônias da cepa-padrão da <i>B. henselae</i> ATCC 49882 ^T recuperadas do ágar, após 35 dias de crescimento, apresentando a mesma morfologia da bactéria observada dentro do eritrócito e a parede trilaminar característica desta bactéria (Aumento original x 80.000).....	45
Figura 4 Pseudo-inclusão em eritrócito de gato infectado pela <i>B. henselae</i> observada através da ME (Guptill et al., 2000).....	53
Figura 5 Pseudo-inclusão em eritrócito de gato não infectado observada através da ME (Guptill et al., 2000).....	53
Figura 6 Pseudo-inclusão em eritrócito de paciente com anemia sem causa definida observada através da ME (Unicamp).....	53
Figura 7 Suposta infecção da <i>B. henselae</i> em eritrócito de gato observada através da ME (Kordick e Breitschwerdt, 1995).....	53
Figura 8 ME de uma célula eritróide diferenciada contendo estrutura intracelular semelhante à <i>B. henselae</i> (Mandle et al., 2005).....	53
Figura 9 Vacúolo intra-eritrocitário englobando um organismo suspeito observado através da ME (O'Rourke et al., 2005).....	53

RESUMO

A *Bartonella henselae*, uma bactéria intracelular facultativa, é conhecida como agente da doença da arranhadura do gato, da angiomatose bacilar, da peliose bacilar hepática, de endocardites e de síndromes bacterêmicas em humanos.

As espécies de *Bartonella* podem causar infecções intra-eritrocitárias e têm sido isoladas do sangue de pacientes por vários métodos. Foi demonstrado que a *B. bacilliformis* e a *B. quintana* infectam células endoteliais e eritrócitos humanos e que a *B. henselae* infecta células humanas (células endoteliais, células epiteliais, monócitos, macrófagos) e eritrócitos de gatos.

O objetivo deste estudo foi investigar, através da microscopia eletrônica de transmissão, se a *B. henselae* infecta eritrócitos humanos maduros.

Uma amostra de um concentrado de hemácias foi infectada experimentalmente com uma cepa-padrão de *B. henselae*. Alíquotas de sangue foram coletadas da amostra imediatamente após a infecção experimental, no minuto 30 e nas horas 1, 5, 10 e 72 para avaliação ultra-estrutural.

A *B. henselae* foi vista aderida a eritrócitos humanos dez horas após a inoculação e no interior de eritrócitos após setenta e duas horas.

Este estudo demonstra que a *B. henselae* se adere a e invade eritrócitos humanos maduros.

Nossos resultados favorecem a possibilidade de que os eritrócitos possam servir como um nicho primário nas infecções causadas por *Bartonella* spp.. Diante desta observação, novos estudos deverão ser realizados para prevenir a transmissão transfusional da *Bartonella* spp..



ABSTRACT

Bartonella henselae, a facultative intracellular bacterium, has been known as the agent of cat scratch disease, bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, endocarditis and bacteraemic syndrome in humans.

Bartonella species can cause intraerythrocytic infections and have been isolated from patients blood stream by several methods. It was demonstrated that *B. bacilliformis* and *B. quintana* infect human endothelial cells and human erythrocytes and *B. henselae* infects erythrocytes of cats.

The aim of our study was to investigate through transmission electron microscopy whether *B. henselae* infects mature human erythrocytes.

One sample of red blood cell (RBC) unit received experimentally standard strain of *B. henselae*. Blood aliquots were collected from infected unit immediately after inoculation, on minute 30 and on hours 1, 5, 10 and 72 for ultrastructural evaluation.

B. henselae was seen adhered to human erythrocytes ten hours after inoculation and inside the erythrocyte after seventy two hours.

This study demonstrates that *B. henselae* adhere to and invades mature human erythrocytes.

Our results favor the possibility that erythrocytes can serve as a primary target in *Bartonella* spp. infections. From this observation, further studies are warranted to prevent *Bartonella* transfusional transmission.

1- INTRODUÇÃO

1.1- As bartonelas

As bactérias do gênero *Bartonella* compreendem numerosas espécies e são responsáveis por um grande número de doenças infecciosas emergentes e reemergentes. São pequenas bactérias Gram-negativas de crescimento lento, cocobacilares, fastidiosas, que crescem melhor em meios enriquecidos com sangue e atmosfera com 5% de gás carbônico (Slhessarenko, 1998; Maggi et al., 2005). Elas pertencem ao subgrupo alpha-2 da classe *Proteobacteria* (Dehio, 2004).

A *B. bacilliformis*, desde a sua identificação por Alberto Barton em 1909, era a única espécie da família *Bartonellaceae*, que junto com as famílias *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae* formavam a ordem das *Rickettsiales*. Em 1991, observou-se estreita relação filogenética entre a então chamada *Rochalimaea quintana* e a *B. bacilliformis* (O'Connor et al., 1991).

O gênero foi posteriormente reclassificado, considerando-se a semelhança existente entre o DNA das bactérias dos gêneros *Rochalimaea* e *Bartonella*, a homologia entre as seqüências da subunidade 16S rRNA (região comum entre as bactérias Gram-negativas) e o conteúdo de guanina-citosina de cada uma, além das suas características fenotípicas. Então, foi proposto que o gênero *Rochalimaea* fosse transferido da família *Rickettsiaceae* para a família *Bartonellaceae*, com a união dos gêneros *Bartonella* e *Rochalimaea*, mantendo-se o primeiro nome por ser este o mais antigo. Assim, as quatro espécies do gênero extinto passaram a ser chamadas de *B. quintana*, *B. vinsonii*, *B. henselae* e *B. elizabethae* (Brenner et al., 1993).

Numerosas espécies de *Bartonella* têm sido descritas recentemente (Dehio, 2004; Ereemeeva et al., 2007) (Quadro 1).

Três espécies de *Bartonella* estão associadas ao maior número de manifestações clínicas em seres humanos. São elas: *B. bacilliformis* (agente da febre de Oroya e da verruga peruana), *B. henselae* (agente da doença da arranhadura do gato, da angiomatose bacilar, da peliose bacilar hepática, de endocardite e de septicemia) e *B. quintana* (agente da febre das trincheiras, da angiomatose bacilar, de bacteremia e de endocardite) (Anderson e Neuman, 1997; Dehio, 2004) (Quadros 1 e 2).

Entre as manifestações cutâneas das bartoneloses estão: eritema nodoso, granuloma anular, eritema multiforme, exantemas, púrpura trombocitopênica, adenopatia crônica e síndrome da fadiga crônica têm sido associados com infecção por *Bartonella* spp. (Raoult et al., 1994; Anderson e Neuman, 1997).

A extrema diversidade da manifestação clínica das doenças depende da infectividade da *Bartonella* spp. e da resposta imune do paciente, entre outros fatores (Rolain et al., 2004). O desenvolvimento de quadros clínicos mais ou menos graves e a diferença de virulência entre as cepas estão relacionados com a existência de diversos genótipos (Cornejo e Vizcarra, 1999; Blanco e Raoult, 2005).

O homem serve como reservatório natural para a *B. bacilliformis* e para a *B. quintana*. A *B. henselae* infecta naturalmente os gatos, mas pode infectar o homem de forma assintomática ou causar uma variedade de sintomas e a gravidade destes parece depender da resposta imune do hospedeiro (Lindroos et al., 2006).

Muitas bartoneloses humanas têm ectoparasitas sugadores de sangue como vetores: lutzomias, piolhos, pulgas e carrapatos (Velho et al., 2006). A transmissão da bactéria por carrapatos ainda não foi comprovada, mas estudos recentes identificaram o DNA da bartonela nestes ectoparasitas (Chang et al., 2001; Breitschwerdt et al., 2007) (Quadro 2).

Cada espécie de *Bartonella* parece estar adaptada a um ou a poucos hospedeiros reservatórios mamíferos, nos quais o agente causa uma bacteremia intra-eritrocitária persistente como marca da infecção (Dehio, 2001; Schulein et al., 2001). Isto acontece com a infecção da *B. henselae* em gatos que são os reservatórios naturais desta bactéria. As taxas de bacteremia e de soroprevalência para a *B. henselae* são altas em gatos de regiões geográficas quentes e úmidas, 7-43% e 4-81%, respectivamente (Dehio, 2004). Os gatos infectados desenvolvem uma bacteremia recorrente que pode persistir por mais de dois anos (Breitschwerdt e Kordick, 2000).

Estudos prévios demonstraram que a *B. henselae* induz a resposta imune humoral específica e também a mediada por células nos hospedeiros infectados natural ou experimentalmente, incluindo gatos, humanos e ratos (Abbott et al., 1997; Regnath et al.,

1998; Guptill et al., 1999; Arvand et al., 2001; Chenoweth et al., 2004; Berghoff et al., 2007). Os mecanismos relacionados à sobrevivência das bactérias por longos períodos, apesar da vigorosa resposta imune do hospedeiro, ainda não estão completamente esclarecidos. Estudos relatam que as espécies de *Bartonella* podem persistir em um nicho intracelular, de onde são liberadas ocasionalmente para invadir as células dos hospedeiros (Dehio, 2001; Schulein et al., 2001; Mandle et al., 2005). Entretanto, o papel de outros fatores que contribuem para a persistência da *Bartonella* nos hospedeiros infectados ainda não foi estudado detalhadamente (Berghoff et al., 2007).

A bactéria pode persistir no sangue de hospedeiros naturais, de forma assintomática e por longos períodos devido a um parasitismo intra-eritrocitário (Jacomio et al., 2002; Rolain et al., 2004).

O nicho primário intracelular em infecções por *Bartonella* sp. permanece ainda desconhecido (Kyme et al., 2005).

A localização intra-eritrocitária da *B. henselae* tem sido demonstrada em eritrócitos de gatos e a *B. bacilliformis* tem sido observada dentro dos eritrócitos humanos durante a fase aguda da doença de Carrión, a febre de Oroya (Rolain et al., 2001; Rolain et al., 2003b).

A febre das trincheiras e a “febre das trincheiras dos dias modernos” são manifestações da infecção por *B. quintana*, sendo esta observada nos eritrócitos de pessoas bacterêmicas (Anderson e Neuman, 1997; Rolain et al., 2003a; Rolain et al., 2004).

A *Bartonella* sp. apresenta um tropismo por células endoteliais e a localização intracelular da *B. henselae* pode ser identificada em células endoteliais infectadas *in vitro* (Dehio, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que a *B. tribocorum* é encontrada em eritrócitos de ratos, mas não causa hemólise (Schulein et al., 2001; Jacomio et al., 2002).

Nos últimos anos, o número de *Bartonella* spp. identificadas aumentou rapidamente e o gênero *Bartonella* atualmente contém 23 espécies e três subespécies (Eremeeva et al., 2007) (Quadro 1).

Em 2007, foi descrita uma nova espécie, a *B. rochalimae*, em um paciente com febre, esplenomegalia e bacteremia, após voltar de uma viagem ao Peru. A doença foi atribuída inicialmente à *B. bacilliformis*, o agente causal da febre de Oroya, que é endêmica na região dos Andes. Entretanto, a análise genética revelou que esta nova bactéria estaria mais próxima da *B. clarridgeiae*, usualmente encontrada em gatos. Esta é a décima primeira bactéria deste gênero que pode infectar o homem (Eremeeva et al., 2007).

Quadro 1- Características clínicas e epidemiológicas das espécies de *Bartonella* identificadas (em destaque, as espécies relacionadas a doenças humanas).

Espécies de <i>Bartonella</i>	Ano de descrição	Reservatórios	Doenças no homem
<i>B. bacilliformis</i>	1909	Homem	DC, BAC
<i>B. talpae</i>	1911	Toupeira	
<i>B. peromysci</i>	1942	Veado, Rato	
<i>B. vinsonii subsp. vinsonii</i>	1946	Roedores	
<i>B. quintana</i>	1961	Homem	FT, DAG, AB, LC, BAC, END, SEP
<i>B. henselae</i>	1992	Gato, cão, homem e outros	DAG, AB, PBH, LC, BAC, END, SEP, ENC
<i>B. elizabethae</i>	1993	Rato	END, Neurorretinite
<i>B. grahamii</i>	1995	Camundongo	Neurorretinite
<i>B. taylorii</i>	1995	Rato	
<i>B. doshiae</i>	1995	Roedores	
<i>B. clarridgeiae</i>	1996	Gato	DAG
<i>B. vinsonii subsp. berkhoffii</i>	1996	Cão	END
<i>B. tribocorum</i>	1998	Rato	
<i>B. koehlerae</i>	1999	Gato	END
<i>B. alsatica</i>	1999	Coelho	
<i>B. vinsonii subsp. arupensis</i>	1999	Camundongo	BAC, END
<i>B. bovis (weissii)</i>	1999	Boi	
<i>B. washoensis</i>	2000	Roedores	Miocardite
<i>B. birtlesii</i>	2000	Rato	
<i>B. shoenbuchensis</i>	2001	Ruminantes	
<i>B. capreoli</i>	2002	Ruminantes	
<i>B. rattimassiliensis</i>	2004	Rato	
<i>B. phoceensis</i>	2004	Rato	
<i>B. chomelii</i>	2004	Boi	
<i>B. rochalimae</i>	2007	?	BAC

DC, doença de Carrión; FT, febre das trincheiras; DAG, doença da arranhadura do gato; AB, angiomatose bacilar; PBH, peliose bacilar hepática; LC, linfadenopatia crônica; BAC, bacteremia; END, endocardite; SEP, septicemia; ENC, encefalopatia.

Quadro 2- Epidemiologia das principais espécies patogênicas ao homem.

Espécies de <i>Bartonella</i>	Vetores	Reservatórios	Distribuição geográfica
<i>B. bacilliformis</i>	Flebótomos (<i>Lutzomyia verrucarum</i>)	Homem	Região dos Andes
<i>B. quintana</i>	Piolho do corpo (<i>Pediculus humanus corporis</i>)	Homem	Universal
<i>B. henselae</i>	Pulga, carrapato (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Gato, cão	Universal

1.2- As bartoneloses

As infecções por *Bartonella* spp. podem afetar todos os órgãos e sistemas. Já foram descritas manifestações respiratórias (nódulos pulmonares e massas cervicais), gastrointestinais (hepatoesplenomegalia, hepatite granulomatosa, peliose bacilar hepática e abscesso hepático), cardíacas (derrame pericárdico, miocardite e endocardite), hematológicas (anemia hemolítica e trombocitopenia), neurológicas (cefaléia crônica, abscesso cerebral, encefalite, convulsões, meningite asséptica e mielite), oftalmológicas (síndrome de Parinaud, neuropatia óptica, retinite aguda, uveíte e endoftalmite) e dermatológicas (eritema nodoso, granuloma anular, eritema polimorfo, exantemas e púrpura). Febre persistente de origem indeterminada, fadiga crônica e bacteremia assintomática também têm sido detectadas em pessoas infectadas pela *B. henselae* (Jacobs e Schutze, 1998; Tsukahara et al., 2000; Van Audenhove et al., 2001; Gerber et al., 2002; Levy et al., 2003; Drancourt et al., 2004; Blanco e Raoult, 2005).

Onze bactérias do gênero *Bartonella* já foram associadas à infecção em humanos (*B. bacilliformis*, *B. henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. koehlerae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. washoensis* e, recentemente, *B. rochalimae*), mas outras espécies têm sido encontradas em reservatórios animais, incluindo gatos, cachorros, veados, leões, bovinos, coelhos, roedores, golfinhos, ruminantes e tartarugas marinhas (Maggi et al., 2005; McGill et al., 2005; Manfredi e Sabbatani, 2006; Ereemeeva et al., 2007; Valentine et al., 2007) (Quadros 1 e 2).

A grande maioria das pessoas que apresentam DAG, PBH ou AB são infectadas pela *B. henselae* ou pela *B. quintana* (Breitschwerdt e Kordick, 2000; Chomel et al., 2004; Boulouis et al., 2005).

Baseado nos resultados dos testes sorológicos considera-se que a *B. clarridgeiae* seja causadora da DAG (Clarridge et al., 1995; Kordick et al., 1997).

A *B. elizabethae* foi isolada em 1992 do sangue de um paciente imunocompetente que apresentava quadro de endocardite e, posteriormente, de espécies de roedores *Rattus norvegicus*. A *B. grahamii*, também isolada de espécies de roedores, foi associada a um quadro de neurorretinite em humano (Kerkhoff et al., 1999; McGill et al., 2005).

Casos de bacteremia e endocardite em humanos já foram associados à *B. vinsonii* (Roux et al., 2000; McGill et al., 2005).

A identificação de um novo patógeno humano, a *B. washoensis*, foi realizada através do isolamento da bactéria no sangue de um paciente com quadro clínico de febre e miocardite (Kosoy et al., 2003).

O DNA da *B. koehlerae* foi recentemente amplificado do sangue de um paciente com endocardite (Avidor et al., 2004).

A identificação da *B. rochalimae*, neste ano, foi observada em uma paciente que sofria com sintomas de anemia grave, esplenomegalia e febre alta (Eremeeva et al., 2007).

Algumas doenças causadas por *Bartonella* spp. podem ter resolução espontânea, mas em outros casos, a doença pode ser fatal sem o tratamento antibiótico adequado (Rolain et al., 2004). O tratamento dos pacientes infectados depende da doença clínica, da resposta do sistema imune do hospedeiro e da gravidade da doença. A DAG é a manifestação clínica mais comum das infecções por bartonela e usualmente é autolimitada. Em pacientes imunodeficientes (especialmente os pacientes com aids), as infecções podem persistir por um longo período, sendo necessário administrar um tratamento profilático (Rolain et al., 2004; Dorbecker et al., 2006).

Os macrolídeos e as tetraciclina são freqüentemente usados como antibióticos de primeira linha para o tratamento da maioria das doenças causadas por *Bartonella* spp.. O tratamento com outros antibióticos como os aminoglicosídeos, as fluoroquinolonas, a rifampicina, a ceftriaxona e o cloranfenicol tem sido relatado com sucesso. Por estes microorganismos serem fastidiosos e por haver um número limitado de cepas isoladas, há pouca informação disponível da susceptibilidade dos antibióticos *in vitro* (Margileth, 1992; Dorbecker et al., 2006).

A DC, a FT, a DAG e a AB são os quadros clínicos mais característicos da infecção por espécies deste gênero.

1.2.1- Doença de Carrión

Em 1885, Daniel Alcides Carrión, um estudante de medicina peruano, tentou demonstrar que duas enfermidades endêmicas em seu país, a febre de Oroya e a verruga peruana, eram fases de uma mesma infecção. Inoculou-se com material extraído de paciente com manifestação clínica da verruga peruana, que veio a falecer, durante quadro febril, como o da febre de Oroya (Velho, 2001).

Em 1909, Alberto Barton, médico peruano, descreveu o agente etiológico da DC, a *B. bacilliformis*, a primeira espécie de *Bartonella* a ser descrita na literatura (Bass et al., 1997). Ela é parasita intracelular de eritrócitos e de células endoteliais, apresenta grande motilidade e pleomorfismo, é multiflagelada-unipolar e cora-se em vermelho-violeta à coloração de Giemsa em esfregaços sangüíneos (Garcia et al., 1990; Bass et al., 1997).

A DC é uma doença bifásica, representada por uma anemia hemolítica aguda (febre de Oroya) e por uma fase crônica (verruga peruana). A doença é transmitida pela picada de mosquitos da espécie *Lutzomia* e o período de incubação no homem varia de 10 até 210 dias. Na febre de Oroya aproximadamente 100% dos eritrócitos são parasitados, produzindo um quadro de anemia grave e septicemia. O quadro clínico é grave e sem tratamento pode ser fatal (Benson et al., 1986; Blanco e Raoult, 2005). A verruga peruana

caracteriza-se pela presença de uma ou múltiplas lesões cutâneas de aspecto angiomatoso, papulosas e pruriginosas, que sangram com facilidade e que se acompanham de dor óssea (Blanco e Raoult, 2005).

Nos pacientes com febre de Oroya, o tratamento de eleição é o cloranfenicol, associado a outros antibióticos, especialmente os betalactâmicos ou as quinolonas (Maguina et al., 2001; Blanco e Raoult, 2005). Para o tratamento da verruga peruana emprega-se a rifampicina ou a estreptomicina. Recentemente, a ciprofloxacina tem sido usada com sucesso para o tratamento de adultos com múltiplas lesões eruptivas, assim como a azitromicina (Rolain et al., 2004).

1.2.2- Febre das trincheiras

A FT foi reconhecida como entidade clínica na epidemia da Primeira Grande Guerra, em 1915. Nesta epidemia foi estimado que mais de um milhão de pessoas tivessem sido afetadas, predominando em militares, tanto das tropas alemãs quanto dos aliados (Maurin e Raoult, 1996).

Também denominada de febre dos cinco dias (quintana), a FT é causada pela *B. quintana*, encontrada na saliva e nas fezes dos piolhos do corpo, infectando o homem quando a pele está lesada. Com um período de incubação entre 15 a 25 dias, a infecção pode ser assintomática ou evoluir para doença grave. Aproximadamente metade dos infectados tem um quadro gripal, de instalação abrupta, porém, sem sintomas respiratórios e de curta duração. Pode ocorrer febre alta e prolongada por semanas, sugerindo febre tifóide. Mesmo que os pacientes se encontrem assintomáticos, estes devem receber tratamento pelo alto risco de desenvolverem endocardite (Raoult, 1999; Blanco e Raoult, 2005).

O tratamento da FT e da bacteremia crônica é feito com a associação de doxiciclina e gentamicina (Rolain et al., 2004).

A *B. quintana* foi associada a quadros de bacteremia crônica em pessoas indigentes e etilistas, sobretudo em populações com prevalente infestação por piolhos do corpo, com más condições de higiene pessoal e de saneamento. Este quadro clínico

reemergente está sendo chamado de “febre das trincheiras urbanas dos dias modernos” (Stein e Raoult, 1995; Anderson e Neuman, 1997; Brouqui et al., 1999).

A bacteremia crônica que ocorre nos pacientes infectados pode estar associada ao aparecimento de endocardite e de AB (Jacomio et al., 2002).

1.2.3- Doença da arranhadura do gato

Em 1950, Robert Debré, professor de pediatria na Universidade de Paris, fez a primeira publicação da doença que já era conhecida como entidade clínica. Mas somente em 1992, Dolan e seus colaboradores fizeram o isolamento da *B. henselae* nos linfonodos de pacientes infectados (Jacomio et al., 2002; Eymin et al., 2006).

A DAG é descrita na maioria dos países do mundo e é a expressão clínica mais freqüente da infecção por bartonelas. É uma doença comum e autolimitada, sendo a principal causa de linfonodomegalia benigna em crianças e adultos jovens (Dehio e Sander, 1999).

A *B. henselae* é o principal agente causador da doença, mas foram descritos casos isolados relacionados com a *B. clarridgeiae*, com a *B. quintana* e com a *Afipia felis*, um outro bacilo Gram-negativo (Kordick et al., 1997; Azevedo et al., 2000; Velho, 2001).

Em 90% dos casos existe um antecedente de contato com gatos através da arranhadura e/ou mordedura, com uma maior incidência nos pacientes que possuem gatos menores do que um ano de idade (Blanco e Raoult, 2005). O gato doméstico é o principal reservatório, mas o cão também já foi descrito (Chung et al., 2005).

A transmissão entre os gatos ocorre através da pulga *Ctenophalides felis*, sendo esta o vetor principal da bactéria entre os felinos (Chomel et al., 1996; Jacomio et al., 2002).

As manifestações clínicas dependem do estado imunológico do paciente. O quadro clínico típico que acomete os indivíduos imunocompetentes caracteriza-se pela presença de linfadenopatia regional precedida por uma pápula eritematosa, não-pruriginosa,

no local do trauma. Em 85% dos casos as adenopatias são únicas. O período de incubação é de poucos dias a várias semanas (Carithers, 1985; Eymen et al., 2006).

São descritas formas atípicas da doença em 5 a 14% dos indivíduos infectados, incluindo a síndrome óculo-glandular de Parinaud, febre prolongada, fadiga, perda de peso, mialgia, artralgia, esplenomegalia, encefalites e outros sintomas neurológicos. Manifestações cutâneas podem ser púrpura trombocitopênica, exantemas máculo-papulares, eritema anular, eritema multiforme e como eritema nodoso (Velho, 2001; Werner et al., 2006).

O diagnóstico sorológico mais utilizado é a detecção de títulos de IgG através da IFI. Os títulos menores que 1:64 podem representar infecção antiga. Os pacientes com DAG frequentemente apresentam títulos iguais ou maiores que 1:256 (Eymen et al., 2006).

O exame anatomopatológico, embora característico, não é patognomônico da DAG. Os achados histológicos na lesão primária e no linfonodo acometido são semelhantes, constituindo-se de formação de granulomas com área necrótica central, circundadas por linfócitos e histiócitos e com infiltrado neutrofílico (Slhessarenko, 1998; Velho et al., 2002).

O tratamento é questionável nos pacientes imunocompetentes pelo fato da DAG ser uma doença benigna e autolimitada. Várias associações de antibióticos têm sido usadas para tratar os pacientes que apresentam complicações da DAG (retinite, encefalopatias e hepatite). A resposta clínica ao tratamento é mais bem observada quando se utiliza a associação de doxiciclina com rifampicina (Rolain et al., 2004). Foi realizado um único estudo prospectivo, duplo-cego, com azitromicina em pacientes imunocompetentes com DAG não complicada. Após 30 dias, os pacientes tratados com este antibiótico apresentaram uma redução significativa no volume do linfonodo em comparação com o grupo-placebo. Mas, não foi demonstrada nenhuma eficácia da azitromicina para o tratamento da DAG disseminada, nem para a prevenção da evolução da DAG localizada para a doença disseminada ou para a prevenção de complicações (Bass et al., 1998).

1.2.4- Angiomatose Bacilar

A AB foi descrita pela primeira vez, em 1983, durante o aparecimento da aids. A AB é mais freqüente em pacientes imunodeficientes, especialmente os soropositivos para o HIV, mas raramente pode comprometer indivíduos imunocompetentes. É causada pela *B. henselae* e pela *B. quintana* (Regnery et al., 1992; Tappero et al., 1993; Anderson e Neuman, 1997; Rolain et al., 2004).

As lesões caracterizam-se por proliferação capilar disposta em lóbulos. As manifestações muco-cutâneas são as mais freqüentes e podem ser papulosas, tumorais ou nodulares, solitárias ou múltiplas. Pode haver lesões praticamente por todo o corpo e o principal diagnóstico diferencial é o sarcoma de Kaposi, com o qual pode co-existir (Cockerell e LeBoit, 1990; Maurin e Raoult, 1996; Spach e Koehler, 1998). Outros diagnósticos diferenciais das lesões cutâneas devem incluir: granuloma piogênico, hemangioma, tumores subcutâneos, angiossarcoma e verruga peruana (Cornejo e Vizcarra, 1999; Rolain et al., 2004).

A AB pode apresentar manifestações extracutâneas, afetando a mucosa respiratória e gastrointestinal, fígado, baço, medula óssea, linfonodos, músculos e sistema nervoso central (Cornejo e Vizcarra, 1999).

Tanto a AB como a PBH são diferentes manifestações clínicas de um processo de proliferação vascular secundárias à infecção pelo gênero *Bartonella* e que ocorrem principalmente nos pacientes com imunodeficiência adquirida (Vasquez et al., 2007). A PBH caracteriza-se por lesões angioproliferativas associadas a dilatações capilares com formação de espaços cavernosos cheios de sangue e ocorre no fígado, baço ou medula óssea (Loutit, 1997; Raoult, 1999).

Embora o diagnóstico possa ser ajudado por exames microbiológicos, sorológicos e por técnicas moleculares, na prática clínica é o exame histológico que mais facilmente possibilita o diagnóstico (Velho et al., 2002).

De evolução potencialmente fatal, usualmente apresenta rápida resposta à antibioterapia com eritromicina ou doxiciclina. O tratamento deve ser prolongado, durante dois a quatro meses, para diminuir o risco de recorrências (Cockerell et al., 1987; Maurin e Raoult, 1996).

1.2.5- Outras doenças

B. quintana, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. kohlerae* e *B. alsatica* foram isoladas de pacientes com endocardite bacteriana. A maioria dos pacientes com endocardite devido à *B. henselae* tem história de exposição a gatos e apresentam lesões pré-existentes na válvula cardíaca (Gouriet et al., 2007).

As endocardites com culturas negativas representam entre 2,5 a 31% de todas as endocardites. Entre as possíveis causas, destacam-se a antibioticoterapia prévia na realização dos hemocultivos, a presença de bactérias de crescimento lento e a dificuldade de algumas bactérias para crescer nos meios de cultivo convencionais. Atualmente, as endocardites por *Bartonella* spp. representam de 1 a 17% de todos os casos de endocardites e a *B. quintana* é a espécie implicada com mais frequência (Oteo et al., 2006).

A existência de bacteremias crônicas é demonstrada nas infecções por *B. bacilliformis*, *B. henselae* e *B. quintana*. Mesmo que os pacientes estejam assintomáticos, estes devem receber tratamento devido ao elevado risco de desenvolverem endocardite (Blanco e Raoult, 2005).

Os quadros de bacteremia relacionados com infecção por bartonela caracterizam-se pelo desenvolvimento de uma sintomatologia prolongada que inclui mal estar, fadiga, anorexia, emagrecimento e febre recorrente. Os sintomas podem se apresentar por semanas a meses antes da realização do diagnóstico pelo isolamento da bactéria nos cultivos de sangue. Esta forma da doença é descrita em pacientes com aids, pacientes com outros tipos de imunodeficiência e também em pacientes imunocompetentes (Cornejo e Vizcarra, 1999).

A bacteremia nos pacientes com infecção pelo HIV caracteriza-se pelo surgimento, de forma insidiosa, de astenia, dor difusa, febre, calafrios, anorexia e perda de peso. Na ausência de tratamento, a duração do quadro pode ser prolongada e as recidivas são frequentes (Koehler et al., 1997).

Linfadenopatia crônica, síndrome da fadiga crônica, febre de origem indeterminada, septicemias, manifestações neurológicas, psiquiátricas, oftalmológicas, ósseas e hematológicas também são associadas à infecção por estes agentes (Velho, 2001).

1.3- A *Bartonella henselae*

A infecção por *B. henselae* é uma zoonose de distribuição mundial. Em indivíduos imunocompetentes a manifestação clínica mais frequente é a DAG clássica. Nos pacientes imunodeficientes, principalmente naqueles com alteração da imunidade celular, a infecção é mais grave e se manifesta com quadros de AB, endocardites, bacteremia e PBH (Ferres et al., 2005).

Ao exame microscópico, a *B. henselae* é caracterizada por pequenos bacilos Gram-negativos, ligeiramente encurvados, de 0,5 a 0,6 µm de diâmetro e 2 µm de comprimento (Cornejo e Vizcarra, 1999). As colônias de primo-isolamento desta bactéria são esbranquiçadas, secas, auto-aderentes, delicadas, com aspecto de couve-flor e incrustadas no ágar (Velho et al., 2002).

A cepa Houston-1 da *B. henselae*, identificada em 1992, tem sido implicada na etiologia da DAG, AB, PBH, endocardite, febre com bacteremia recorrente, osteomielite e de várias desordens neurológicas. A cepa Marselha da *B. henselae* foi associada à DAG em paciente imunocompetente (McGill et al., 2005). A possibilidade de desenvolvimento de quadros clínicos mais ou menos graves está relacionada com a existência de diversos genótipos e/ou com a imunidade do hospedeiro (Blanco e Raoult, 2005).

A incidência anual de todas as infecções por *B. henselae* em humanos é desconhecida. Nos Estados Unidos da América, em todas as suas regiões, foram diagnosticados 22 mil casos de DAG ao ano com mais de duas mil internações anuais (Bass et al., 1997).

Das espécies de *Bartonella*, a *B. henselae* é a bactéria isolada do maior número de animais. Ela é capaz de conviver de forma assintomática com a maioria deles, inclusive com o homem. Os gatos domésticos são considerados os principais reservatórios da *B. henselae*, sendo esta bactéria transmitida entre eles principalmente pela picada da pulga (*Ctenocephalides felis*). A prevalência entre gatos varia de acordo com a região geográfica e pode ser maior que 80% entre os gatos sadios e 55% destes podem estar bacterêmicos (Ferres et al., 2005; Werner et al., 2006).

No Brasil, um estudo de soroprevalência da *B. henselae* entre gatos recolhidos nas ruas de São Paulo mostrou que 46% deles apresentavam sorologia positiva para esta bactéria e destes 33% eram bacterêmicos e assintomáticos (Slhessarenko et al., 1996).

Deste modo, a *B. henselae* pode estar presente como agente zoonótico de forma endêmica nos grupos de população que se expõem aos gatos. O risco é de especial importância nos pacientes imunodeficientes primários e secundários (principalmente imunodeficiência pela aids), nos quais a história de contato com gatos é um antecedente importante diante de quadros infecciosos e/ou de febre de origem indeterminada. Ao mesmo tempo, esta informação também é de extrema importância nos pacientes imunocompetentes que apresentam linfadenopatias regionais, síndrome febril prolongada e outras manifestações atípicas como encefalites, retinites e granulomas hepatoesplênicos (Ferres et al., 2005).

1.4- Infecção de células e de eritrócitos

A fisiopatologia da infecção pelas diferentes espécies de *Bartonella* é complexa e todas apresentam em comum o fato de possuírem tropismo pelas hemácias e pelas células endoteliais. A habilidade de uma bactéria causar proliferação de células endoteliais, resultando na formação de novos vasos, é única no gênero *Bartonella* (Anderson e Neuman, 1997).

Os eritrócitos humanos podem ser infectados pelos protozoários *Plasmodium* sp. e *Babesia* sp. e por bactérias da família *Bartonellaceae*, como a *B. quintana* e a *B. bacilliformis* (Ihler, 1996; Dehio, 2001; Rolain et al., 2003a; Rolain et al., 2003b).

A capacidade de invasão da *B. henselae* foi demonstrada em células endoteliais, células epiteliais, monócitos e macrófagos (Batterman et al., 1995; Dehio et al., 1997; Kempf et al., 2000; Kempf et al., 2001; Resto-Ruiz et al., 2002; Kempf et al., 2005).

A localização intra-eritrocitária da *B. henselae* foi descrita somente em eritrócitos de gatos (Kordick e Breitschwerdt, 1995; Dehio, 2001; Rolain et al., 2001).

Os modelos de experimentação animal nos permitem conhecer que, após a inoculação das bartonelas no sangue, estas desaparecem à microscopia eletrônica confocal rapidamente da corrente circulatória, permanecendo estéril, pelo menos, durante 72h. Posteriormente, do 4º ao 5º dia, após a inoculação, estas bactérias reaparecem no sangue. O nicho primário da infecção por *Bartonella* ainda permanece desconhecido (Blanco e Raoult, 2005; Kyme et al., 2005).

A bactéria pode persistir no sangue de hospedeiros naturais de forma assintomática e por longos períodos, resultando numa bacteremia intra-eritrocitária persistente como marca da infecção (Jacomio et al., 2002; Dehio, 2004; Rolain et al., 2004; Boulouis et al., 2005).

Em indivíduos imunodeficientes, a *B. henselae* promove proliferação tumoral das células endoteliais na pele e nos órgãos internos, causando respectivamente a AB e a PBH (Kempf et al., 2005).

A infecção humana persistente com *B. bacilliformis* e *B. quintana* tem sido documentada, enquanto que a infecção com *B. henselae* é geralmente considerada autolimitada (Brouqui et al., 1999; Chomel et al., 2003; Boulouis et al., 2005).

Recentemente, o DNA da *B. henselae* foi amplificado no sangue de uma criança quatro meses após o diagnóstico da DAG (Arvand e Schad, 2006).

No ano de 2007, foi realizado um estudo da *B. henselae* no sangue de pessoas imunocompetentes que tiveram contato freqüente com gatos e exposição a alguns artrópodos (pulgas, carrapatos, mosquitos, piolhos), concluindo que a *B. henselae* pode induzir infecção oculta em pessoas imunocompetentes (Breitschwerdt et al., 2007).

1.5- Ultra-estrutura das bartonelas

A análise da ultra-estrutura das bartonelas em tecidos, através da microscopia eletrônica, permite a identificação de bacilos intra e extracelulares. O citoplasma bacilar contém uma substância protéica elétron-densa, homogênea e amorfa, podendo apresentar

grânulos elétron-densos agregados e também filamentos finos. São encontradas áreas escuras (*dark spots*) que correspondem ao DNA densamente compactado e áreas claras que ocorrem devido à distribuição mais homogênea deste material ou a ausência dele (Merrell et al., 1978; Cockerell et al., 1991; Velho, 2001).

Quando observadas através da ME, as bactérias Gram-negativas exibem uma típica parede trilaminar delgada, em torno de 10 nm de espessura, apresentando um contorno irregular. As três lâminas são formadas por uma membrana externa de lipopolissacáride, por um espaço periplásmico (peptideoglicano) e por uma membrana citoplasmática (Merrell et al., 1978; Guptill et al., 2000).

Há na literatura controvérsia em relação à identidade das estruturas intra-eritrocitárias observadas pela ME, se bactérias de fato ou apenas pseudo-inclusões. As pseudo-inclusões são artefatos de preparação quando os eritrócitos fixados são seccionados através de uma borda irregular e vistos em duas dimensões. Estes artefatos são pleomórficos e podem se assemelhar à bactéria. As pseudo-inclusões são cercadas por uma única parede lipídica e contêm destroços que lembram o DNA bacteriano. Comprovando este fato, Guptill et al. (2000) realizaram um estudo infectando experimentalmente gatos livres de patógenos específicos com *B. henselae* e, através da ME, detectaram pseudo-inclusões nos eritrócitos dos gatos infectados, mas também nos eritrócitos de gatos não infectados pela bactéria. Assim, adotaram como critério para a análise da ultra-estrutura da bactéria a identificação da parede trilaminar (Guptill et al., 2000).

1.6- Métodos diagnósticos

As espécies de *Bartonella* têm sido demonstradas em pacientes por vários métodos, como exame direto, cultura, exame histopatológico, sorologia, PCR e ME.

Não existe um método padrão-ouro para o diagnóstico das bartoneloses.

1.6.1- Exame direto

O esfregaço sangüíneo, corado pelo método de Giemsa, é descrito no diagnóstico da infecção pela *B. bacilliformis* e é utilizado no seguimento do paciente para avaliação do prognóstico, já que o encontro de bactérias mais cocóides indicam boa evolução do quadro clínico. Quadros febris, sobretudo acompanhados de anemia, poderão ter a sua etiologia infecciosa definida a partir deste exame. Na febre de Oroya, este método diagnóstico é extremamente útil, pois 80 a 100% dos eritrócitos circulantes podem estar parasitados (Garcia-Caceres e Garcia, 1991; Bass et al., 1997; Velho et al., 2002).

1.6.2- Cultura

Para o cultivo das espécies de *Bartonella*, é necessário utilizar o emprego de um meio enriquecido com sangue (coelho, carneiro ou cavalo), além de uma atmosfera com 5% de CO₂ em uma temperatura a 37° C (Blanco e Raoult, 2005).

A cultura da bactéria a partir de amostras de tecidos ou de sangue não é o melhor método diagnóstico para estes agentes, pois requerem meios enriquecidos com sangue e com altos níveis de CO₂ (Anderson e Neuman, 1997). O isolamento da bartonela pela cultura é difícil, pois o crescimento bacteriano é lento, ocorrendo entre duas a seis semanas de cultivo. A cultura sangüínea ou tecidual, não se aplica à rotina dos laboratórios de patologia clínica, tanto por seu tempo prolongado de cultivo quanto pelas condições especiais necessárias para o crescimento das bactérias (Bergmans et al., 1997; Zanutto, 2000).

1.6.3- Exame histopatológico

No exame histopatológico são encontrados dois padrões de infecção por bartonela, a angioproliferação e o padrão granulomatoso. Nas doenças granulomatosas de etiologia desconhecida as bartonelas devem ser pesquisadas. O exame histopatológico é útil para o diagnóstico de AB, PBH, verruga peruana e DAG. A AB e a verruga peruana são

histologicamente indistinguíveis e caracterizam-se por proliferação endotelial disposta em lóbulos. Na DAG, os achados histológicos são granulomas com área necrótica central, formando microabscessos. Na peliose bacilar observam-se dilatações capilares associadas à angioproliferação. A coloração com hematoxilina-eosina revela processos inflamatórios inespecíficos, necessitando de colorações especiais que podem aumentar a sensibilidade do exame. A coloração pela prata pode facilitar a identificação destes agentes (Anderson e Neuman, 1997; Blanco e Raoult, 2005).

1.6.4- Sorologia

O diagnóstico sorológico é o mais utilizado. As técnicas para detectar anticorpos séricos são a IFI e as provas de imunoabsorção ligadas a enzimas (ELISA). O teste da IFI é o mais utilizado para o diagnóstico de DAG. Dependendo da forma de obtenção do antígeno (ágar ou cultivo celular) a resposta sorológica pode variar. A diferença dos métodos de cultivo convencional para os meios de cultivo que empregam linhagens celulares (células endoteliais) é que estes são os mais sensíveis e o crescimento das bactérias é mais rápido (La Scola e Raoult, 1999; Blanco e Raoult, 2005).

Por outro lado, variações genótípicas podem explicar a existência de discordâncias sorológicas observadas (Blanco e Raoult, 2005). O ponto de corte do diagnóstico para os pacientes com DAG é um título de IgG 1:64 e daqueles com endocardite é de 1:800. Podem existir reações cruzadas entre as espécies *B. henselae* e *B. quintana*, como também com outras espécies do gênero *Chlamydia*. A sorologia pode ser negativa nos pacientes infectados pelo HIV (Maurin et al., 1997; Blanco e Raoult, 2005; Boulouis et al., 2005).

Para La Scola e Raoult, a sorologia não serve para o diagnóstico de AB, já que seus pacientes foram na grande maioria soronegativos e tiveram o diagnóstico confirmado em 100% deles pela detecção gênica por PCR (La Scola e Raoult, 1999). A variabilidade antigênica entre as cepas de *B. henselae* também pode causar resultados falso-negativos na IFI em pessoas com suspeita de DAG (Breitschwerdt et al., 2007).

1.6.5- PCR

As técnicas de detecção genética pela PCR têm a finalidade de auxiliar no diagnóstico da infecção pelas *Bartonella* spp. e também nos estudos epidemiológicos das espécies e cepas desse gênero ou em sua genotipagem. Sua identificação baseia-se na caracterização molecular da cultura obtida ou do material suspeito da infecção. Esses materiais podem ser coletados por biópsia ou por aspirado de linfonodos. Podem-se empregar bactérias que crescem de hemoculturas de pacientes com endocardite ou febre, amostras de tecidos ou utilizar cultura de bactérias armazenadas em laboratórios (Velho, 2001; Boulouis et al., 2005). A região intergênica 16S-23S rRNA mostrou-se um alvo apropriado por conter regiões com seqüências gênicas divergentes o suficiente para permitir a diferenciação de espécies (Jensen et al., 2000).

Comparados à cultura bacteriológica, a extração do DNA de amostras de tecidos para a realização da PCR tem sido o melhor método para o diagnóstico de infecção por bartonela no homem. Amostra de tecidos congelados ou espécimes de biópsia fresca podem ser facilmente testados. A análise do PCR de tecidos embebidos na parafina é mais difícil, porém possível de realização (Boulouis et al., 2005).

O uso da PCR ainda é limitado, pois não faz parte da rotina da maioria dos laboratórios de patologia clínica ou dos hospitais, ficando restrito aos centros de pesquisa.

1.6.6- Microscopia eletrônica de transmissão

A ME, embora possibilite o diagnóstico pelo encontro dos bacilos, não diferencia as espécies de *Bartonella*. Através deste método, observam-se bacilos intra e extracelulares com alteração da ultra-estrutura das células do hospedeiro. Medem aproximadamente 0,2 µm de diâmetro e 1,0 µm a 2,5 µm de comprimento (Hadfield et al., 1985; Wear et al., 1985).

A ME permite a individualização dos agentes de parede trilaminar. A parede celular de aspecto trilaminar, que caracteriza a bactéria Gram-negativa, é formada por glicocálix no exterior, uma fina camada semelhante à peptidoglicano ao redor do

protoplasma bacilar. Material elétron-lucente (um vacúolo) e substância elétron-densa homogênea e amorfa são encontrados no citoplasma bacilar (Guptill et al., 2000; Velho, 2001; Velho et al., 2006). A parede trilaminar não é específica para o gênero, mas não existem outros agentes bacterianos conhecidos que apresentem esta característica e sejam intra-eritrocitários.

Estas informações demonstram que não existe um método padronizado para o diagnóstico das bartonelas. Nenhum método é capaz de diagnosticar todos os casos.

A cultura foge da rotina dos laboratórios de microbiologia, pois estes desprezam as culturas negativas em sete dias e o crescimento das bartonelas pode ser muito lento. O exame histológico não permite a definição do diagnóstico nosológico e as técnicas de detecção genética não estão disponíveis para uso clínico na maioria dos centros médicos do mundo (Velho et al., 2003).

A sorologia, através da IFI, é o método mais utilizado para o diagnóstico das bartoneloses, porém os *kits* sorológicos estão disponíveis somente para as pesquisas (Velho et al., 2003).

A ME é um método caro e está disponível em poucos serviços.

2- OBJETIVO

Avaliar a capacidade de invasão da *B. henselae* em eritrócitos humanos através da microscopia eletrônica de transmissão.

3- MÉTODOS

3.1- *Bartonella henselae*

A cepa de *B. henselae* (Houston 1, American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC 49882^T) utilizada neste estudo foi fornecida pelo banco de bactérias do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, SP, Brasil e encaminhada ao Laboratório de Patologia Clínica, setor de Microbiologia, do Hospital das Clínicas, HC-Unicamp, onde foi mantida.

3.2- Crescimento das colônias

As bactérias foram semeadas em placas de Petri, em meio de ágar enriquecido com 5% de sangue de carneiro e incubadas em estufa a 37°C, sob uma atmosfera com 5% de CO₂.

Os meios de cultura utilizados foram preparados no próprio serviço. Foram utilizados meios com 24 horas de preparo, guardados sob refrigeração a 8°C, sendo aquecidos à temperatura ambiente imediatamente antes da semeadura.

3.3- Suspensão bacteriana

As colônias destas bactérias, com dez dias de crescimento, foram coletadas superficialmente e diretamente do ágar de uma das placas e imersas em BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid®) para a obtenção da suspensão de inoculação.

Esta suspensão foi diluída com BHI até a equivalência com o tubo 10 da escala de McFarland. Este procedimento permitiu a obtenção de uma suspensão inicial com concentração de aproximadamente 3×10^9 unidades formadoras de colônia/mL (Velho et al., 2002).

3.4- Infecção experimental do eritrócito humano

Uma unidade de CH, proveniente de doador de sangue sadio, foi coletada em CPDA-1 (Fresenius, Asem-NPBI, Itapeverica da Serra, São Paulo, Brazil). O sangue foi centrifugado (3500g, 10 min) para a preparação do CH e nenhuma solução preservativa foi adicionada.

Foram coletados nove mL do CH em sistema estéril (sterile connecting sampling site coupler, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, USA) e estes foram infectados com um mL da suspensão de bactérias. Imediatamente após, 50µL do CH foram coletados no minuto zero e o restante do CH infectado foi mantido incubado a 37°C. Outras cinco alíquotas também foram coletadas no minuto 30 e nas horas: 1, 5, 10 e 72 para posterior avaliação à ME de transmissão, após conservação em meio de Karnovsky (Velho, 2001).

3.5- Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram posteriormente fixadas em tetróxido de ósmio a 2% por duas horas, foram deixadas *over night* em acetato de uranila 0,5%. A desidratação foi executada em uma série crescente de soluções de acetona e a inclusão foi feita em resina epóxi, permanecendo na estufa à temperatura de 60°C por 48 horas. Cortes semifinos, com aproximadamente 300 nm, foram feitos com navalha de vidro no ultramicrotomo MT-6000 XL-RMC e corados com azul de toluidina 2% para melhor seleção da área. Cortes ultrafinos, de aproximadamente 90 nm, foram realizados com navalha de diamante (Diatome), no ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, colocados em tela de cobre e corados com citrato de chumbo, e foram examinados no microscópio eletrônico LEO-906 da Zeiss.

3.6- Critério para identificação da *B. henselae* à microscopia eletrônica de transmissão

Na análise dos cortes ultrafinos através da ME foram estudados o tamanho, a cor e a forma das estruturas observadas. O critério utilizado para a identificação da ultra-estrutura da bactéria foi o tamanho e a forma compatíveis, quando comparada ao eritrócito, e a observação da típica parede trilaminar, característica das bactérias Gram-negativas.

4- RESULTADOS

Foram examinados todos os tempos de infecção, mas não foram encontradas estruturas aderidas e nem estruturas intra-eritrocitárias, nos tempos 0, 30min, 1h e 5h após a infecção, que atendessem ao critério para a identificação da bactéria já descrito.

A *B. henselae* foi vista aderida a eritrócitos humanos 10h após a inoculação e dentro de eritrócitos humanos após 72h (Figuras 1 e 2).

Na Figura 1, as duas bartonelas aderidas ao eritrócito estão envolvidas por uma única membrana externa que compõe a parede trilaminar, típica das bactérias Gram-negativas. Na superfície da membrana do eritrócito, onde as bactérias se encontram aderidas, há uma alteração na densidade desta membrana. Na Figura 2, a bactéria encontra-se no interior do eritrócito, junto a um vacúolo, apresentando as mesmas características da *B. henselae* da cepa ATCC 49882^T isolada de uma colônia, como observada na Figura 3.

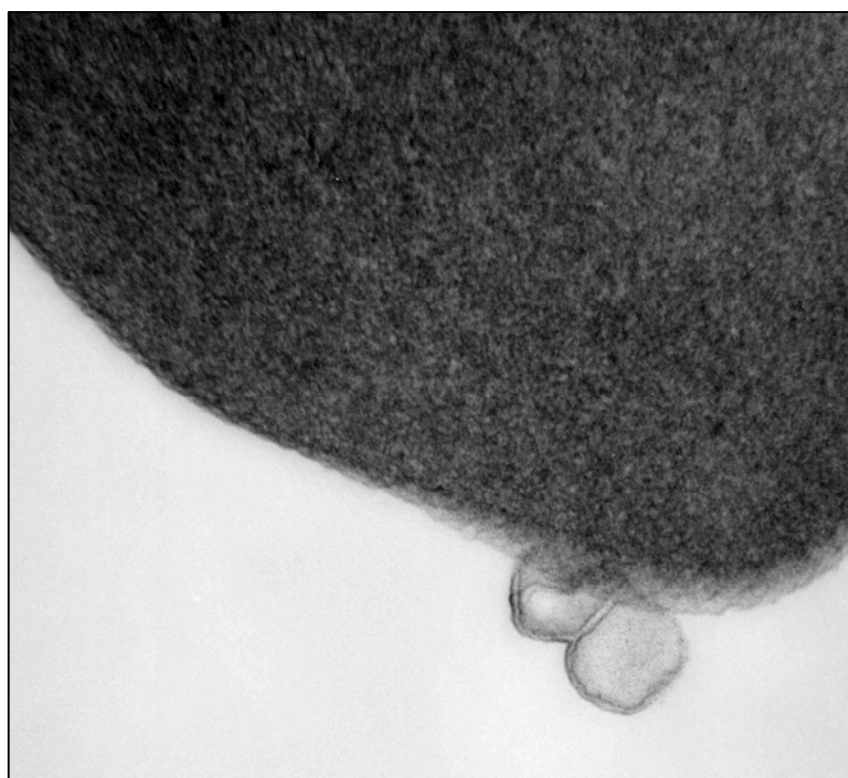


Figura 1- Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a adesão da *B. henselae* ao eritrócito humano após 10h da infecção. A análise da ME demonstrou a típica parede trilaminar (x 20.000).

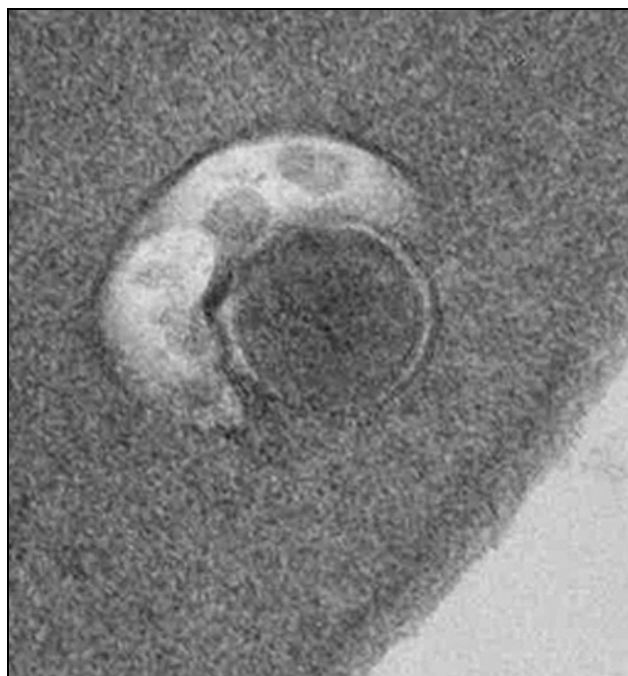


Figura 2- Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a invasão do eritrócito humano pela *B. henselae* após 72h da infecção (Aumento original x 35.970).

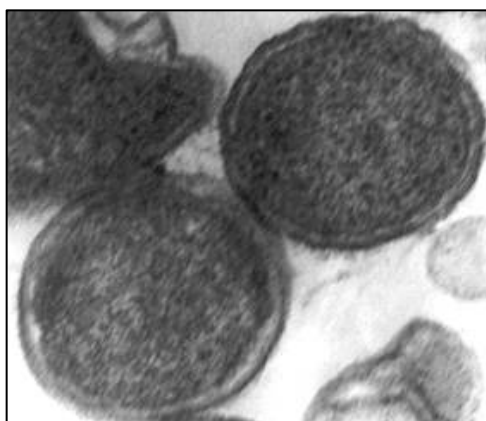


Figura 3- Microscopia eletrônica das colônias da cepa padrão da *B. henselae* ATCC 49882^T recuperadas do ágar, após 35 dias de crescimento, apresentando a mesma morfologia da bactéria observada dentro do eritrócito e a parede trilaminar característica desta bactéria (Aumento original x 80.000).

5- DISCUSSÃO

As bartonelas são um fascinante grupo de patógenos emergentes. Apresentam tropismo por células endoteliais e eritrócitos, conferindo a elas uma exceção ao postulado de Koch, o qual afirma que as bactérias não ocorrem no sangue e nos tecidos do homem sadio. Ao contrário desta premissa, culturas de sangue obtidas de indivíduos imunocompetentes apresentam positividade para as espécies de *Bartonella* (La Scola e Raoult, 1999; Jacomo et al., 2002; Breitschwerdt et al., 2007).

As bartoneloses humanas são doenças cuja patogênese ainda é pouco conhecida. Períodos prolongados de parasitismo intra-eritrocitário são fundamentais na patogenicidade das espécies de *Bartonella* (Schulein et al., 2001; Schulte et al., 2006). Como exemplo, a *B. bacilliformis*, agente da febre de Oroya, invade os eritrócitos humanos e causa uma anemia hemolítica grave, marca da fase febril e imunossupressora da doença de Carrión (Mitchell e Minnick, 1995; Velho et al., 2006).

A *B. henselae* é uma das mais estudadas bactérias do gênero e é conhecida como agente da DAG, AB, PHB, bacteremia, de endocardites, entre outras doenças (Rolain et al., 2001). Dentre as espécies de *Bartonella*, esta é a responsável pelo maior número de manifestações clínicas (Kempf et al., 2005). Várias dermatoses, entre outras manifestações pouco usuais, foram associadas à *B. henselae*, como eritema nodoso, granuloma anular, eritema polimorfo, exantemas e púrpura (Velho et al., 2006).

Alguns ectoparasitas sugadores de sangue são vetores para as bartoneloses: lutzomias, piolhos, pulgas e carrapatos (Velho et al., 2006). A *B. henselae* encontra-se nas fezes das pulgas dos gatos (principais reservatórios desta bactéria), mas ainda não se sabe a importância da pulga como vetor para o homem (Boulouis et al., 2005).

Um estudo da soroprevalência para a *B. henselae* em gatos recolhidos nas ruas de São Paulo mostrou que 46% destes apresentavam sorologia positiva e 33% eram bacterêmicos de forma assintomática (Slhessarenko et al., 1996). O organismo também foi isolado do sangue de 40 a 70% de gatos aparentemente saudáveis, dependendo da localização geográfica estudada (Breitschwerdt e Kordick, 2000; Dehio, 2004). Portanto, estes resultados demonstram a alta incidência da *B. henselae* nestes reservatórios, mesmo que estes se encontrem assintomáticos.

Em humanos, a análise da soroprevalência da infecção pela *B. henselae* mostrou positividade em 2 a 6% da população normal nos Estados Unidos, 48% na Suíça e 19% na Alemanha (Velho, 2001). No Brasil, estudo soropidemiológico para a *B. quintana* e para a *B. henselae* na região de Minas Gerais, evidenciou elevadas taxas de soroprevalência na população estudada, respectivamente 13,7% e 12,8% (da Costa et al., 2005). Estas variações percentuais encontradas possivelmente estão relacionadas com a existência de diferentes cepas, como a *B. henselae* tipo Houston I e II e tipo Marselha. Este dado também explicaria o desenvolvimento de vários quadros clínicos relacionados com a existência de diversos genótipos. O genótipo Houston da *B. henselae* foi identificado em casos humanos de DAG, enquanto que o genótipo Marselha foi isolado predominantemente nas populações de gatos (Boulouis et al., 2005).

Não existe um método padrão-ouro para o diagnóstico das bartonelas. O diagnóstico laboratorial geralmente é confirmado pela sorologia ou pela PCR. A sorologia através do teste de IFI é o método diagnóstico mais usado, mas não fornece o diagnóstico em todos os casos. Dependendo da forma de obtenção do antígeno (ágar ou cultivo celular) a resposta sorológica também pode variar. Por outro lado, a diversidade de variantes genotípicas explica a existência de discordâncias sorológicas (Blanco e Raoult, 2005).

Para o isolamento das espécies é requerido um período longo de incubação e condições especiais de crescimento (Dorbecker et al., 2006). Mas, isto raramente é possível, pois na rotina dos laboratórios de microbiologia, as culturas bacterianas são desprezadas com sete dias e as bartonelas necessitam de até seis semanas para crescerem.

O exame direto do sangue, corado pelo método de Giemsa, é útil no diagnóstico de febre de Oroya e no seguimento do paciente infectado pela *B. bacilliformis*. Quadros febris, sobretudo acompanhados de anemia, poderão ter a sua etiologia infecciosa definida a partir deste exame diagnóstico (Velho et al., 2006).

O exame histopatológico é importante na diferenciação dos padrões de infecção na AB e na verruga peruana (angioproliferação) daqueles da DAG (padrão granulomatoso).

Colorações especiais pela prata, como Warthin Starry, e imunohistologia facilitam a identificação destes agentes (Velho et al., 2003).

A detecção genética pela PCR pode ajudar no diagnóstico através da identificação das espécies. A região intergênica 16S rRNA é comum entre as bactérias Gram-negativas (Jensen et al., 2000). A detecção do DNA bacteriano e posterior identificação das espécies em amostras de tecido fresco, nos pacientes com AB, apresentam uma sensibilidade de até 100% (Vasquez et al., 2007). Atualmente, a PCR é o método diagnóstico mais sensível e específico quando associada aos meios de cultura pré-enriquecidos, mas não está disponível para o uso clínico na maioria dos centros médicos do mundo (Blanco e Raoult, 2005; Velho et al., 2006; Breitschwerdt et al., 2007).

A microscopia eletrônica permite a individualização dos agentes de parede trilaminar (Guptill et al., 2000; Velho, 2001). Esta não é específica para o gênero *Bartonella*, mas não se conhecem outros agentes bacterianos que se apresentem no interior das hemácias. A parede trilaminar da bactéria é facilmente observada, notando-se a presença das três lâminas formadas por uma membrana externa, por um espaço periplásmico e por uma membrana citoplasmática (Merrell et al., 1978; Gupta et al., 2000). Quando comparada ao eritrócito, a bactéria apresenta-se normalmente mais elétron-densa. Nos eritrócitos, as bactérias são encontradas regularmente dentro de vacúolos intracelulares (Iwaki-Egawa e Ihler, 1997). Estes achados foram encontrados no presente estudo.

Em culturas de sobrenadantes incubadas com a *B. henselae* e com a *B. bacilliformis* foi demonstrado que os eritrócitos apresentam alteração na superfície da membrana devido a um fator de deformação (proteína deformina), produzido por estas bactérias (Iwaki-Egawa e Ihler, 1997). Esta deformação pode ser observada na Figura 1.

Num concentrado de hemácias, de um paciente saudável, são observadas células homogêneas e estas não contêm organelas em seu interior. Embora as bartonelas possam ser mais elétron-densas à ME, muitas vezes a textura de uma hemácia e de uma bactéria pode ser semelhante. Como já mencionado, pode haver diferença na elétron-densidade destas bactérias. Por isso a importância da identificação da parede trilaminar.

Contudo, a dificuldade na utilização da ME como um método padronizado para a identificação das bartonelas se deve ao fato deste ser caro e não estar disponível em todos os serviços.

Portanto, nenhum método é capaz de diagnosticar todos os casos de bartoneloses. A sensibilidade do exame direto, do exame histopatológico, da cultura, da PCR e da ME ainda é insatisfatória (Velho, 2001). A falta de padronização destas técnicas e a inexistência de uma com sensibilidade e especificidade adequadas têm gerado inconstância nos resultados diagnósticos.

O tratamento das infecções por bartonela depende da manifestação clínica, do sistema imune do hospedeiro e da gravidade da doença. As recomendações para o tratamento antibiótico são baseadas em dados limitados de poucos estudos clínicos (Rolain et al., 2004). Os macrolídeos e as tetraciclina são usados como antibióticos de primeira escolha para o tratamento da maioria das doenças causadas por bartonelas. Pela natureza fastidiosa destes organismos e também número reduzido de cepas isoladas, poucas informações sobre a susceptibilidade *in vitro* está disponível (Dorbecker et al., 2006).

Em humanos infectados pela *B. henselae* o tratamento é diferente para os pacientes imunocompetentes que apresentam sintomas clássicos de DAG, daqueles pacientes imunodeficientes com quadro de proliferações angiomatosas. Muitos agentes antimicrobianos têm sido utilizados para o tratamento da DAG típica, entretanto, na maioria das vezes, os antibióticos parecem não encurtar ou melhorar o curso da infecção (Blanco e Raoult, 2005; Boulouis et al., 2005). Nos pacientes imunodeficientes que apresentam AB ou PBH, os agentes antimicrobianos mais utilizados são a tetraciclina, a eritromicina, a rifampicina, a azitromicina, a doxiciclina ou a combinação destes. O tratamento deve ser administrado nestes pacientes por no mínimo seis semanas e deve ser continuado durante quatro a seis meses naqueles que apresentarem recorrência da infecção (Boulouis et al., 2005).

O mecanismo preciso da ação antibiótica na infecção por bartonela permanece desconhecido. A resposta inicial à terapia antibiótica na febre de Oroya e na AB é precocemente observada, porém na maioria dos casos de DAG típica o tratamento parece

ser ineficaz. Os antibióticos não impedem a evolução da febre de Oroya para a verruga peruana, nem a recrudescência em pacientes com FT e AB. Mesmo com o tratamento não há segurança da erradicação da bactéria (Velho et al., 2003).

As espécies de *Bartonella* podem viver dentro dos eritrócitos humanos, como já foi demonstrado para a *B. quintana* e para a *B. bacilliformis*. A localização intra-eritrocitária da *B. henselae* tem sido demonstrada somente em eritrócitos de gatos (Dehio, 2001; Rolain et al., 2001; Rolain et al., 2003a).

A *B. henselae* pode infectar células endoteliais, células epiteliais, monócitos e macrófagos, mas há controvérsias sobre a capacidade desta bactéria invadir eritrócitos humanos (Batterman et al., 1995; Dehio et al., 1997; Kempf et al., 2000; Kempf et al., 2001; Resto-Ruiz et al., 2002; Kempf et al., 2005; Mandle et al., 2005).

Estudo recente sugeriu que a *B. henselae* não seria capaz de aderir a e infectar os eritrócitos humanos, somente as células progenitoras hematopoiéticas humanas e estas poderiam servir como nicho primário da infecção (Mandle et al., 2005). Entretanto, sabe-se que a *B. bacilliformis* e a *B. quintana* invadem os eritrócitos de seus hospedeiros naturais (Dehio, 2001; Rolain et al., 2003a).

Há na literatura controvérsias em relação à identidade das estruturas observadas dentro dos eritrócitos pela ME, se bactérias de fato ou apenas pseudo-inclusões. As pseudo-inclusões são artefatos pleomórficos e podem se assemelhar à bactéria (Guptill et al., 2000).

Guptill et al. (2000) realizaram um estudo infectando experimentalmente gatos livres de patógenos específicos com *B. henselae* e, através da ME, detectaram pseudo-inclusões nos eritrócitos dos gatos infectados e gatos não infectados pela bactéria (Guptill et al., 2000) (Figuras 4 e 5). Por esta razão, os autores adotaram como critério ultra-estrutural para a identificação da bactéria a observação da parede trilaminar. As pseudo-inclusões semelhantes às descritas foram observadas através da ME em um paciente com anemia sem causa definida internado no Hospital de Clínicas da Unicamp (Figura 6). Estudo anterior demonstrou, através da ME, a *B. henselae* em eritrócitos de gatos (Kordick e Breitschwerdt, 1995) (Figura 7). Posteriormente, este resultado foi questionado por apresentar estruturas idênticas quando comparadas com as pseudo-inclusões (Guptill et al., 2000).

Em publicações mais recentes, por exemplo, o trabalho que excluiu a possibilidade de invasão do eritrócito humano pela bartonela, observam-se estruturas à ME que não apresentam a parede trilaminar típica das bactérias Gram-negativas (Mandle et al., 2005). Neste trabalho a imagem descrita assemelha-se à bartonela, mas não apresenta os critérios utilizados para definir a ultra-estrutura da bactéria (Figura 8). Este mesmo fato ocorreu em uma publicação realizada no mesmo ano, quando se observou a imagem de um vacúolo intra-eritrocitário englobando um organismo suspeito de ser *B. quintana* (O'Rourke et al., 2005) (Figura 9).

As imagens de ME de transmissão apresentadas, a seguir (Figuras 4-9), mostram estruturas intra-eritrocitárias que são prováveis pseudo-inclusões, pois estas não apresentam os critérios propostos para a confirmação da ultra-estrutura da bartonela.

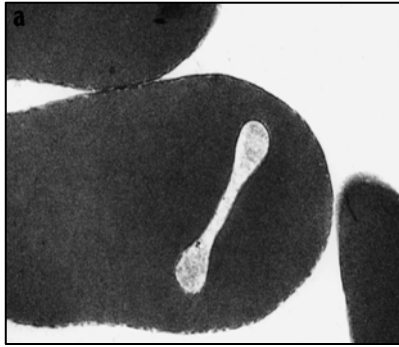


Figura 4- Pseudo-inclusão em eritrócito de gato infectado pela *B. henselae* observada através da ME (Guptill et al., 2000).

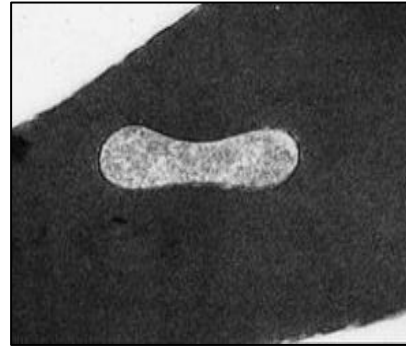


Figura 5- Pseudo-inclusão em eritrócito de gato não infectado observada através da ME (Guptill et al., 2000).

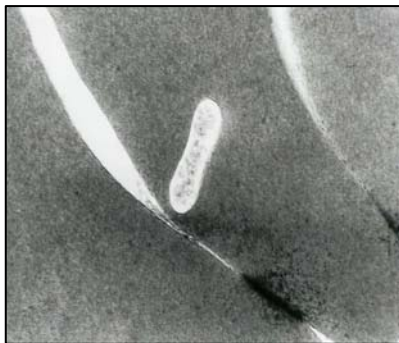


Figura 6- Pseudo-inclusão em eritrócito de paciente com anemia sem causa definida observada através de ME (Unicamp).

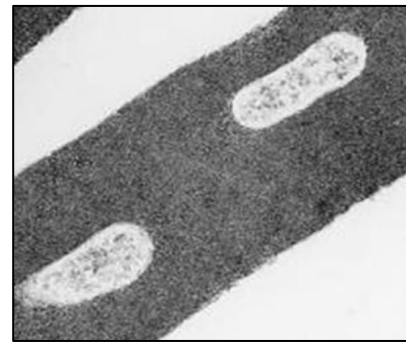


Figura 7- Suposta infecção da *B. henselae* em eritrócito de gato observada através da ME (Kordick e Breitschwerdt, 1995).

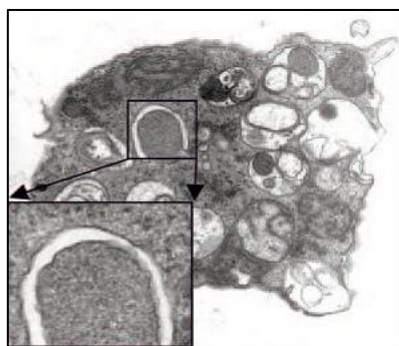


Figura 8- ME de uma célula eritróide diferenciada contendo estrutura intracelular semelhante à *B. henselae* (Mandle et al., 2005).

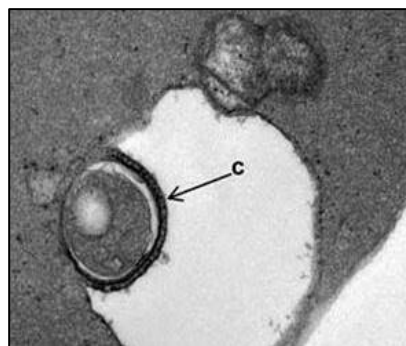


Figura 9- Vacúolo intra-eritrocitário englobando um organismo suspeito observado através da ME (O'Rourke et al., 2005).

O homem é o reservatório de espécies de *Bartonella*, portanto o risco de transmissão sanguínea deve ser considerado. Pesquisa recente realizada na Unicamp demonstrou que a *B. henselae* permanece viável em uma unidade de concentrado de hemácias depois de 35 dias estocada a 4°C (trabalho não publicado). Neste estudo, foi realizada a ME em amostras do CH e estruturas sugestivas de bartonela puderam ser observadas no interior das hemácias, 35 dias após a infecção experimental. Este dado reforça a possibilidade de transmissão através de unidades de sangue coletadas de doadores assintomáticos. Além disso, os testes normalmente usados para a triagem dos doadores de sangue não detectam estes agentes, incluindo a hemocultura de rotina.

Entretanto, o risco de infecção transfusional pela *B. henselae* vem sendo subestimado. O estudo de Lucey (Lucey et al., 1992) sugeriu que pessoas infectadas por *Bartonella henselae* deveriam abster-se da doação sanguínea até a obtenção de hemoculturas negativas após a terapêutica antimicrobiana. Considerando que muitos dos receptores de transfusão sanguínea são ou podem se tornar imunodeficientes, há a necessidade de se priorizar as pesquisas nesta área para evitar a transmissão transfusional destas bactérias. Entre gatos esta possibilidade já foi confirmada (Kordick et al., 1999).

Em 2007, foi demonstrada a presença da *B. henselae* no sangue de pessoas imunocompetentes que tiveram contato freqüente com gatos e exposição a alguns artrópodos (pulgas, carrapatos, mosquitos, piolhos), concluindo que a *B. henselae* pode induzir infecção oculta em pessoas imunocompetentes (Breitschwerdt et al., 2007). Contudo, estes indivíduos assintomáticos poderiam ser incluídos na rotina de doação de sangue.

No estudo presente, eritrócitos humanos foram infectados com *B. henselae* e, através da ME, a bactéria foi vista aderida a estes eritrócitos dez horas após a infecção e dentro do eritrócito humano após setenta e duas horas. Os resultados reforçam que os eritrócitos podem servir como nicho primário nas infecções causadas por *Bartonella* spp.. Portanto, este trabalho demonstra que a *B. henselae* adere e invade eritrócitos humanos maduros.

6- CONCLUSÃO

Foi demonstrada através da microscopia eletrônica de transmissão que a *B. henselae* se adere a e invade eritrócitos humanos maduros após algumas horas do contato experimental desta bactéria com uma amostra de concentrado de hemácias.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1997; 20:41-51.

Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997; 10:203-19.

Arvand M, Ignatius R, Regnath T, Hahn H, Mielke ME. *Bartonella henselae*-specific cell-mediated immune responses display a predominantly Th1 phenotype in experimentally infected C57BL/6 mice. Infect Immun 2001; 69:6427-33.

Arvand M, Schad SG. Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. J Clin Microbiol 2006; 44:2288-90.

Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, et al. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. J Clin Microbiol 2004; 42:3462-8.

Azevedo ZM, Higa LY, Boechat PR, Boechat MB, Klaplauch F. Cat-scratch disease caused by *Bartonella quintana* in an infant: an unusual presentation. Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33:313-7.

Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. Pediatr Infect Dis J 1997; 16:163-79.

Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, Sisler CL, Chan DS, Vincent JM, et al. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. Pediatr Infect Dis J 1998; 17:447-52.

Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. Infect Immun 1995; 63:4553-6.

Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. Infect Immun 1986; 54:347-53.

Berghoff J, Viezens J, Guptill L, Fabbi M, Arvand M. *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology* 2007; 153:2045-51.

Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF, Vos MC, Sabbe LJ, Ossewaarde JM, et al. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1931-7.

Blanco JR, Raoult D. Diseases produced by *Bartonella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:313-9; quiz 320.

Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 2005; 36:383-410.

Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:428-38.

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Duncan AW, Nicholson WL, Hegarty BC, Woods CW. *Bartonella* species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:938-41.

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43:777-86.

Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med* 1999; 340:184-9.

Carithers HA. Diagnosis of cat-scratch disease. *Pediatrics* 1985; 76:325-6.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1221-6.

Chenoweth MR, Somerville GA, Krause DC, O'Reilly KL, Gherardini FC. Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:656-63.

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1952-6.

Chomel BB, Kasten RW, Sykes JE, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990:267-78.

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224:1270-9.

Chung JY, Han TH, Kim BN, Yoo YS, Lim SJ. Detection of *Bartonella henselae* DNA by polymerase chain reaction in a patient with cat scratch disease: a case report. *J Korean Med Sci* 2005; 20:888-91.

Clarridge JE, 3rd, Raich TJ, Pirwani D, Simon B, Tsai L, Rodriguez-Barradas MC, et al. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2107-13.

Cockerell CJ, Whitlow MA, Webster GF, Friedman-Kien AE. Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet* 1987; 2:654-6.

Cockerell CJ, LeBoit PE. Bacillary angiomatosis: a newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22:501-12.

Cockerell CJ, Tierno PM, Friedman-Kien AE, Kim KS. Clinical, histologic, microbiologic, and biochemical characterization of the causative agent of bacillary (epithelioid) angiomatosis: a rickettsial illness with features of bartonellosis. *J Invest Dermatol* 1991; 97:812-7.

Cornejo W, Vizcarra H. *Bartonella henselae*: Nuevo patógeno en humanos. Anales de la Facultad de Medicina: Universidad Nacional Mayor de San Marcos 1999; 60:281-292.

da Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100:853-9.

Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. J Cell Sci 1997; 110 (Pt 18):2141-54.

Dehio C, Sander A. *Bartonella* as emerging pathogens. Trends Microbiol 1999; 7:226-8.

Dehio C. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. Trends Microbiol 2001; 9:279-85.

Dehio C. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. Annu Rev Microbiol 2004; 58:365-90.

Dorbecker C, Sander A, Oberle K, Schulin-Casonato T. In vitro susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. J Antimicrob Chemother 2006; 58:784-8.

Drancourt M, Bodaghi B, Lepidi H, Le Hoang P, Raoult D. Intraocular detection of *Bartonella henselae* in a patient with HLA-B27 uveitis. J Clin Microbiol 2004; 42:1822-5.

Eremeeva ME, Gerns HL, Lydy SL, Goo JS, Ryan ET, Mathew SS, et al. Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized bartonella species. N Engl J Med 2007; 356:2381-7.

Eymin G, Zapata A, Andrade M, Aizman A, Rojas L, Rabagliati R. Cat-scratch disease. Review of eight adult patients hospitalized for fever or adenopathy. Rev Med Chil 2006; 134:1243-8.

Ferres M, Abarca K, Godoy P, Garcia P, Palavecino E, Mendez G, et al. Presence of *Bartonella henselae* in cats: natural reservoir quantification and human exposition risk of this zoonoses in Chile. Rev Med Chil 2005; 133:1465-71.

Garcia FU, Wojta J, Broadley KN, Davidson JM, Hoover RL. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. Am J Pathol 1990; 136:1125-35.

Garcia-Caceres U, Garcia FU. Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrion. Am J Clin Pathol 1991; 95:S58-66.

Gerber JE, Johnson JE, Scott MA, Madhusudhan KT. Fatal meningitis and encephalitis due to *Bartonella henselae* bacteria. J Forensic Sci 2002; 47:640-4.

Gouriet F, Lepidi H, Habib G, Collart F, Raoult D. From cat scratch disease to endocarditis, the possible natural history of *Bartonella henselae* infection. BMC Infect Dis 2007; 7:30.

Guptill L, Slater L, Wu CC, Glickman LT, Lin TL, Welch DF, et al. Immune response of neonatal specific pathogen-free cats to experimental infection with *Bartonella henselae*. Vet Immunol Immunopathol 1999; 71:233-43.

Guptill L, Wu CC, Glickman L, Turek J, Slater L, HogenEsch H. Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats. Vet Microbiol 2000; 76:283-90.

Hadfield TL, Malaty RH, Van Dellen A, Wear DJ, Margileth AM. Electron microscopy of the bacillus causing cat-scratch disease. J Infect Dis 1985; 152:643-5.

Ihler GM. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. FEMS Microbiol Lett 1996; 144:1-11.

Iwaki-Egawa S, Ihler GM. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. FEMS Microbiol Lett 1997; 157:207-17.

Jacobs RF, Schutze GE. *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. Clin Infect Dis 1998; 26:80-4.

Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:8-18.

Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. J Clin Microbiol 2000; 38:1717-22.

Kempf VA, Schaller M, Behrendt S, Volkmann B, Aepfelbacher M, Cakman I, et al. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cell Microbiol 2000; 2:431-41.

Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, et al. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. Cell Microbiol 2001; 3:623-32.

Kempf VA, Schairer A, Neumann D, Grassl GA, Lauber K, Lebidziejewski M, et al. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. Cell Microbiol 2005; 7:91-104.

Kerkhoff FT, Bergmans AM, van Der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. J Clin Microbiol 1999; 37:4034-8.

Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfeld MJ, Chen FM, Berger TG, et al. Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. N Engl J Med 1997; 337:1876-83.

Kordick DL, Breitschwerdt EB. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. J Clin Microbiol 1995; 33:1655-6.

Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, et al. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). J Clin Microbiol 1997; 35:1813-8.

Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. J Clin Microbiol 1999; 37:1536-47.

Kosoy M, Murray M, Gilmore RD, Jr., Bai Y, Gage KL. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. J Clin Microbiol 2003; 41:645-50.

Kyme PA, Haas A, Schaller M, Peschel A, Iredell J, Kempf VA. Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae* -containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. Cell Microbiol 2005; 7:1019-34.

La Scola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). J Clin Microbiol 1999; 37:1899-905.

Levy PY, Fournier PE, Carta M, Raoult D. Pericardial effusion in a homeless man due to *Bartonella quintana*. J Clin Microbiol 2003; 41:5291-3.

Lindroos H, Vinnere O, Mira A, Repsilber D, Naslund K, Andersson SG. Genome rearrangements, deletions, and amplifications in the natural population of *Bartonella henselae*. J Bacteriol 2006; 188:7426-39.

Loutit JS. *Bartonella* infections. Curr Clin Top Infect Dis 1997; 17:269-90.

Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Wegner S, et al. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. Clin Infect Dis 1992; 14:683-8.

Maggi RG, Harms CA, Hohn AA, Pabst DA, McLellan WA, Walton WJ, et al. *Bartonella henselae* in porpoise blood. Emerg Infect Dis 2005; 11:1894-8.

Maguina C, Garcia PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. Clin Infect Dis 2001; 33:772-9.

Mandle T, Einsele H, Schaller M, Neumann D, Vogel W, Autenrieth IB, et al. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. Blood 2005; 106:1215-22.

Manfredi R, Sabbatani S. Bartonellosis: suggestive case reports in adult and pediatric patients and therapeutic issues. *Braz J Infect Dis* 2006; 10:411-5.

Margileth AM. Antibiotic therapy for cat-scratch disease: clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:474-8.

Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2283-7.

Maurin M, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:273-92.

McGill S, Wesslen L, Hjelm E, Holmberg M, Auvinen MK, Berggren K, et al. *Bartonella* spp. seroprevalence in healthy Swedish blood donors. *Scand J Infect Dis* 2005; 37:723-30.

Merrell BR, Weiss E, Dasch GA. Morphological and cell association characteristics of *Rochalimaea quintana*: comparison of the Vole and Fuller strains. *J Bacteriol* 1978; 135:633-40.

Mitchell SJ, Minnick MF. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* 1995; 63:1552-62.

O'Connor SP, Dorsch M, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Stackebrandt E. 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2144-50.

O'Rourke LG, Pitulle C, Hegarty BC, Kraycirik S, Killary KA, Grosenstein P, et al. *Bartonella quintana* in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1931-4.

Oteo JA, Castilla A, Aroseay A, Blanco JR, Ibarra V, Morano LE. Endocarditis due to *Bartonella* spp. Three new clinical cases and Spanish literature review. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:297-301.

- Raoult D. *Bartonella* infection in humans. Presse Med 1999; 28:429-34, 438.
- Raoult D, Drancourt M, Carta A, Gastaut JA. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat. Lancet 1994; 343:977.
- Regnath T, Mielke ME, Arvand M, Hahn H. Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host. Infect Immun 1998; 66:5534-6.
- Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, 3rd, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. J Clin Microbiol 1992; 30:265-74.
- Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, Newton C, Klein TW, Friedman H, et al. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. Infect Immun 2002; 70:4564-70.
- Rolain JM, La Scola B, Liang Z, Davoust B, Raoult D. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. J Clin Microbiol 2001; 39:2978-80.
- Rolain JM, Maurin M, Mallet MN, Parzy D, Raoult D. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. Antimicrob Agents Chemother 2003a; 47:614-9.
- Rolain JM, Novelli S, Ventosilla P, Maguina C, Guerra H, Raoult D. Immunofluorescence detection of *Bartonella bacilliformis* flagella in vitro and in vivo in human red blood cells as viewed by laser confocal microscopy. Ann N Y Acad Sci 2003b; 990:581-4.
- Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:1921-33.

Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 2000; 38:1698-700.

Schulein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piemont Y, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. J Exp Med 2001; 193:1077-86.

Schulte B, Linke D, Klumpp S, Schaller M, Riess T, Autenrieth IB, et al. *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. Infect Immun 2006; 74:5003-13.

Slhessarenko N. Doença da arranhadura do gato: aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais em 38 pacientes. [Tese de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998.

Slhessarenko N, Camargo MCGO, D'Auria SRN, Moureiz ESM, Camargo ME. Soroprevalência de *Bartonella henselae* em gatos do município de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop 1996; 29:104.

Spach DH, Koehler JE. *Bartonella*-associated infections. Infect Dis Clin North Am 1998; 12:137-55.

Stein A, Raoult D. Return of trench fever. Lancet 1995; 345:450-1.

Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, Swaminathan B, Berger TG, LeBoit PE, et al. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. JAMA 1993; 269:770-5.

Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Murano I, Takahashi H, Uchida M. *Bartonella henselae* infection as a cause of fever of unknown origin. J Clin Microbiol 2000; 38:1990-1.

Valentine KH, Harms CA, Cadenas MB, Birkenheuer AJ, Marr HS, Braun-McNeill J, et al. *Bartonella* DNA in loggerhead sea turtles. Emerg Infect Dis 2007; 13:949-50.

Van Audenhove A, Verhoef G, Peetermans WE, Boogaerts M, Vandenberghe P. Autoimmune haemolytic anaemia triggered by *Bartonella henselae* infection: a case report. Br J Haematol 2001; 115:924-5.

Vasquez TP, Chanqueo CL, Garcia CP, Poggi MH, Ferres GM, Bustos MM, et al. Bacillary angiomatosis caused by *Bartonella quintana* in an human immunodeficiency virus positive patient. Rev Chilena Infectol 2007; 24:155-9.

Velho PE. Estudo das bartoneloses humanas e da *Bartonella henselae*: infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletrônica de transmissão. [Tese de Doutorado]. Campinas: Unicamp; 2001.

Velho PE, de Moraes AM, Uthida-Tanaka AM, Cintra ML, Gigliogi R. Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. Ultrastruct Pathol 2002; 26:161-9.

Velho PE, Cintra ML, Uthida-Tanaka AM, de Moraes AM, Mariotto A. What do we (not) know about the human bartonelloses? Braz J Infect Dis 2003; 7:1-6.

Velho PE, de Souza EM, Cintra ML, de Moraes AM, Uthida-Tanaka AM. Diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp.: a propósito de um caso de angiomatose bacilar. An Bras Dermatol 2006; 81:349-353.

Wear DJ, Malaty RH, Zimmerman LE, Hadfield TL, Margileth AM. Cat scratch disease bacilli in the conjunctiva of patients with Parinaud's oculoglandular syndrome. Ophthalmology 1985; 92:1282-7.

Werner JA, Feng S, Kasten RW, Hodzic E, Chomel BB, Barthold SW. Cloning, characterization, and expression of *Bartonella henselae* p26. Clin Vaccine Immunol 2006; 13:830-6.

Zanutto MS. Estudo da infecção dos felinos domésticos (*Felis domesticus* - Linnaeus, 1758) por *Bartonella henselae* através do isolamento e da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em sangue. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.

8- ANEXO

***Bartonella henselae* infects human erythrocytes**

Luiza Helena Urso Pitassi, M.D.¹; Renata Ferreira Magalhães, M.D.¹; Maria Lourdes Barjas-Castro, M.D., Ph.D.²; Erich Vinicius de Paula, M.D., Ph.D.²; Marilucia Ruggiero Martins Ferreira³; Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, M.D., Ph.D.¹.

Departments of Dermatology¹, Hematology² and Pathology³, Medical School, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil.

Running head: *B. henselae* infects human erythrocytes

Word count: 1072 words

No conflict of interest

No financial support

Correspondence and reprint requests to Luiza Pitassi

Department of Internal Medicine (Dermatology), Medical School, State University of Campinas-UNICAMP.

Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, 13.081-970, Campinas, SP, Brazil.

Fone/Fax: 55-19-3289-4107

E-mail: pitassi@yahoo.com; lpitassi@fcm.unicamp.br

Abstract

Bartonella henselae, a facultative intracellular bacterium, has been known as the agent of cat scratch disease, bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, endocarditis and bacteraemic syndrome in humans.

Bartonella species can cause intraerythrocytic infections and have been isolated from patients blood stream by several methods. It was demonstrated that *B. bacilliformis* and *B. quintana* infect human endothelial cells and human erythrocytes and *B. henselae* infects erythrocytes of cats.

The aim of our study was to investigate through transmission electron microscopy whether *B. henselae* infects mature human erythrocytes.

One sample of red blood cell (RBC) unit received experimentally standard strain of *B. henselae*. Blood aliquots were collected from infected unit immediately after inoculation, on minute 30 and on hours 1, 5, 10 and 72 for ultrastructural evaluation.

B. henselae was seen adhered to human erythrocytes ten hours after inoculation and inside the erythrocyte after seventy two hours.

This study demonstrates that *B. henselae* adhere to and invades mature human erythrocytes.

Our results favor the possibility that erythrocytes can serve as a primary target in *Bartonella* spp. infections. From this observation, further studies are warranted to prevent *Bartonella* spp. transfusional transmission.

Key words: Bartonella; Erythrocytes; Microscopy, Electron

Introduction

Bacteria of the genus *Bartonella* are fastidious, Gram-negative, aerobic bacilli that comprise numerous species [1]. The extreme diversity of disease manifestations is dependent on the infecting of *Bartonella* spp. and on the immune status of the patient [2].

Three *Bartonella* species are associated with an increasing number of clinical manifestations in human beings. *B. bacilliformis* causes Oroya fever and verruga peruana; *B. henselae* causes cat scratch disease, bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, endocarditis and septicemia; and *B. quintana* causes trench fever, bacillary angiomatosis, bacteremia and endocarditis [3,4].

Erythema nodosum, granuloma annulare, erythema multiforme, exanthemas, thrombocytopenic purpura, chronic adenopathy and chronic fatigue syndrome have been associated with *Bartonella* spp. infection [4,5].

Each *Bartonella* species appears to be highly adapted to one or few mammalian reservoir hosts, in which *Bartonella* causes a long-lasting intraerythrocytic bacteremia as a hallmark of infection [6,7]. The bacteria can persist in the bloodstream of the host as the result of intraerythrocytic parasitism [2,8].

The primary intracellular niche in *Bartonella* sp. infections remains unclear [9].

Intraerythrocytic localization of *B. henselae* has been demonstrated in cat erythrocytes and *B. bacilliformis* have been observed within erythrocytes during the acute phase of Carrion's disease (Oroya fever) [10,11].

Trench fever and "modern-day trench fever" are a manifestation of infection with *B. quintana* that is observed in the erythrocytes of bacteremic homeless people [2,4,12].

Bartonella sp. has a tropism for endothelial cells, and intracellular *B. henselae* can be identified in endothelial cells infected in vitro [7].

Recently, it has been shown that *B. tribocorum* occurs in the erythrocytes of rats and does not cause hemolysis [6,8].

In the present report, our objective was to demonstrate that *B. henselae* adhere to and invades mature human erythrocytes.

Study design

The *B. henselae* strain (Houston 1, American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC 49882^T) used in this study was supplied by the bacteria bank of Adolpho Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil. The bacteria was grown on 5% sheep blood agar plates and incubated at 37°C in 5% CO₂ enriched atmosphere.

Bacterial suspension was performed mixing bacteria colonies obtained from sheep blood agar plates with brain and heart infusion (BHI). This suspension of *B. henselae* colonies was used to obtain equivalence with tube 10 of McFarland scale, which determined an initial suspension with approximately 3x10⁹ colony-forming units (CFU)/mL [13].

One red blood cell (RBC) unit from healthy blood donor was collected in CPDA1 (Fresenius, Asem-NPBI, Itapeverica da Serra, São Paulo, Brazil). Blood was centrifuged (3500g, 10 min) for component preparation and no additive/preservative solution was added. A total of nine mL of RBC was collected using a sterile connecting sampling site coupler (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, USA) and was infected with one mL of the bacterium suspension. Then, 50µL of RBC was collected on minute 0 (immediately after infection) and the remaining of the infected RBC was kept incubated at 37°C. Five aliquots else were collected on minute 30 and hours 1, 5, 10 and 72 for electron microscopy evaluation, after conservation in Karnovsky medium [13].

Briefly, the samples were then fixed in 2% osmium tetroxide for 2 hours and left overnight in uranyl acetate 0.5%. Dehydration was performed with acetone solutions; inclusion was made in epoxy resin, which was heated to 60°C for 48 h. The semithin sections were made around 300 nm with a glass razor, in the MT-6000 XL-RMC ultramicrotome, and stained with toluidine blue 2%, for better area selection. Ultrathin sections of approximately 90 nm, were obtained through a diamond razor (Diatome), with the Leica Ultracut UCT ultramicrotome, laid on copper mesh, stained with lead citrate, and examined in the Zeiss LEO-906 electron microscope.

Results and discussion

Bartonella typical structures could be seen adhered to human erythrocytes in samples collected ten hours after infection (Figure 1) and inside erythrocytes after seventy two hours (Figure 2). They presented the trilaminar wall, which have been previously shown to be specific of Gram-negative bacteria [13,14].

Bartonella species are closely associated with erythrocytes in their natural hosts. There is evidence that *B. henselae* can infect endothelial cells [15,16,17], epithelial cells [18,19], monocytes or macrophages [20,21], but there are controversies about its capability to invade red blood cells [22-25].

Species of *Bartonella* can live inside red blood cells, as was demonstrated for *B. quintana* and *B. bacilliformis*. Intraerythrocytic localization of *B. henselae* has been demonstrated in cat erythrocytes [7,10,12].

Previous studies have shown that *B. henselae* can infect freshly isolated human CD34 hematopoietic progenitor cells but not human erythrocytes [22].

Man is a reservoir of *Bartonella* sp. and the risk for blood transmission should be considered. In a previous study at the State University of Campinas (UNICAMP) it was demonstrated that *B. henselae* remains viable in red blood cell units after standard storage period (data not shown). These data reinforce the possibility of infection through blood units collected from asymptomatic blood carriers. Furthermore, the tests that are usually carried out for triage of donated blood bags do not detect these agents, including the routine hemoculture.

Human erythrocytes were infected with *B. henselae* and invasion of erythrocytes was demonstrated by TEM. In conclusion, our study favors the possibility that erythrocytes can serve as the primary target in *Bartonella* spp. infections. From this observation, further studies are warranted to evaluate the potential of *Bartonella* sp. transfusional transmission.

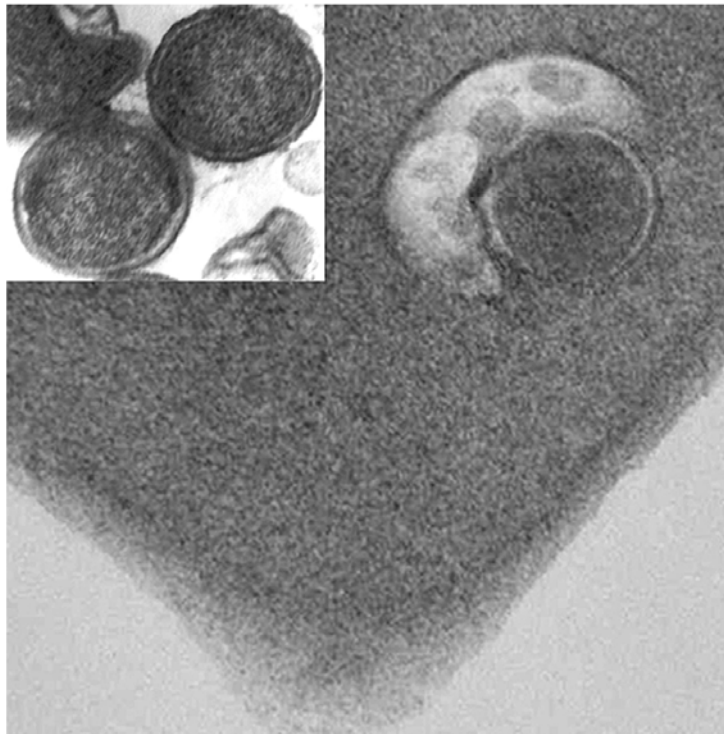
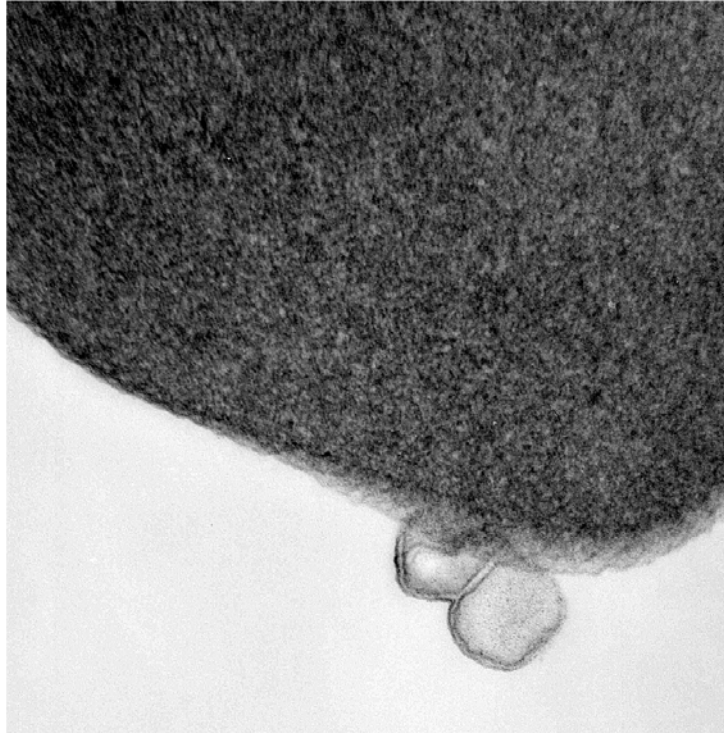


Figure 1- Adherence of *B. henselae* in human erythrocytes. Samples of infected RBC were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). *B. henselae* could be observed adhered to human erythrocytes in samples collected ten hours after infection. TEM analysis demonstrates the typical trilaminar wall bacilli (original magnification x 20,000).

Figure 2- Invasion of human red blood cell (RBC) with *B.henselae*. Erythrocytes were infected with *B. henselae* strain ATCC 49882^T. Transmission electron microscopy (TEM) analysis showed intracellular *B. henselae* inside an erythrocyte seventy two hours after infection (original magnification x 35.970). In detail, TEM photography of the original culture of *B. henselae* used in infection studies.

References

- 1- Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. J Clin Microbiol. 2005; 43:2651-2655.
- 2- Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species, Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:1921-1933.
- 3- Dehio, C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 2004; 58: 365-390.
- 4- Anderson B, Neuman M. *Bartonella spp.* as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997; 10:203-219.
- 5- Raoult D, Drancourt M, Carta A, Gastaut JA. *Bartonella(Rochalimaea) quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat. Lancet.1994; 343:977.
- 6- Schulein R, Seubert A, Gille C, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. J Exp Med. 2001; 193:1077-1086.
- 7- Dehio, C. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. Trends Microbiol. 2001; 9:279-285.
- 8- Jacomo V, Kelly PJ and Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9:8-18.
- 9- Kyme PA, Haas A, Schaller M, Peschel A, Iredell J, Kempf VA. Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae*- containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. Cell Microbiol. 2005; 7(7):1019-1034.

- 10- Rolain JM, La SB, Liang Z, Davoust B, Raoult D. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. J Clin Microbiol. 2001; 39:2978-2980.
- 11- Rolain JM, Novelli S, Ventosilla P, et al. Immunofluorescence detection of *Bartonella bacilliformis* flagella in vitro and in vivo in human red blood cells as viewed by laser confocal microscope. Ann NY Acad Sci. 2003; 990:581-4.
- 12- Rolain JM, Maurin M, Mallet MN, Parzy D, Raoult D. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 614-619.
- 13- Velho PEN, Moraes AM, Cintra ML, Uthida-Tanaka AM, Gigliogi R. Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. Ultrastruct Pathol. 2002; 26(3):161-9.
- 14- Guptill L, Wu CC, Glickman L, Turek J, Slater L and HogenEsch H. Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats. Vet. Microbiol. 2000; 76:283-290.
- 15- Kempf VA, Schaller M, Behrendt S, et al. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cell Microbiol. 2000; 2: 431-441.
- 16- Riess T, Andersson SG, Lupas A, et al. *Bartonella* adhesin mediates a proangiogenic host cell response. J Exp Med. 2004; 200:1267-1278.
- 17- Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalization of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. J. Cell Sci. 1997; 110:2141-2154.
- 18- Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, et al. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. Cell Microbiol. 2001; 3:623-632.

- 19- Batterman H J, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. Infect Immun. 1995; 63: 4553-4556.
- 20- Kempf VA, Schairer A, Neumann D, et al. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. Cell Microbiol. 2005; 7:91-104.
- 21- Resto-Ruiz S I, Schmiederer M, Sweger D, et al. Induction of potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. Infect Immun. 2002; 70:4564-4570.
- 22- Mandle T, Einsele H, Schaller M, et al. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. Blood. 2005; 106:1215-1222.
- 23- Iwaki-Egawa S, Ihler GM. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cells membranes and to bind to red cells ghost proteins. FEMS Microbiol Lett. 1997; 157: 207-217.
- 24- Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler M. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. Infect Immun. 1986; 54: 347- 353.
- 25- Tarantolo SR, Landmark JD, Iwen PC, et al. *Bartonella*-like erythrocyte inclusions in thrombotic thrombocytopenic purpura. Lancet. 1997; 350:1602.